

プロトプラスト融合によるネギ (*Allium fistulosum* L.)
の新育種素材の開発に関する研究

(Studies on the development of breeding lines by
protoplast fusion in Japanese bunching onion (*Allium
fistulosum* L.))

下 中 雅 仁

2 0 0 2

プロトプラスト融合による
ネギ (*Allium fistulosum* L.) の
新育種素材の開発に関する研究

目 次

第 I 章 緒 言	1
第 II 章 ネギの懸濁細胞培養および植物体再生系の確立	6
第 1 節 材料および方法	6
第 2 節 結果	10
第 3 節 考察	25
第 4 節 摘要	29
第 III 章 ネギプロトプラスト培養法の確立	30
第 1 節 材料および方法	30
第 2 節 結果	34
第 3 節 考察	62
第 4 節 摘要	68
第 IV 章 ネギとタマネギとの電気細胞融合条件	69
第 1 節 材料および方法	69
第 2 節 結果	71
第 3 節 考察	78
第 4 節 摘要	80
第 V 章 ネギとタマネギの体細胞雑種の育成	82
第 1 節 材料および方法	82
第 2 節 結果	86
第 3 節 考察	101
第 4 節 摘要	106
第 VI 章 総合考察	108
和文摘要	113
Summary	117
謝 辞	121
引用文献	122
学会公表論文リスト	133

第 I 章 緒 言

ネギ (*Allium fistulosum* L., $2n = 2x = 16$) はユリ科 (*Liliaceae*) のネギ属 (*Allium*) に属する野菜である。その栽培の歴史は古く、6世紀の中国の古書「齊民要術」には土寄せのことが記載されていることから、当時すでにネギの品種や栽培法が発達していたことが推定される (青葉, 2000)。本邦での記載は10世紀の「本草和名」に始まるとされ、明治時代に入ってから各地で独自の改良が進み、‘千住’、‘九条’、‘加賀’などの品種群が形成された (八畝, 1978)。ネギの日本国内での総出荷量は42万トン (2001年度) で、野菜生産量の中では第10位を占める重要な作物である。しかし、その育種については従来から集団選抜法が主流で、他の重要野菜に比較すると立ち遅れているといえる。

鳥取県で栽培されている千住群品種の‘伯州ネギ’は、良食味の優れた形質を有するが、近年はさび病 (病原菌; *Puccinia allii*) の蔓延による被害が多発している。また、集団選抜された品種であることから、均一な生育が保証されないという問題点も指摘されている。前者の問題を解決する方法として、さび病抵抗性遺伝子の導入が考えられる。ネギ品種の中にはこの遺伝子は現在のところ確認されていないが、ネギ属植物の中のタマネギ (*A. cepa* L.) は本病に対する耐病性が知られているので (Jennings et al., 1990)、その形質の付与が望まれる。他方、ネギの均一な生育を確保するためには、 F_1 品種の開発が有効な手段と考えられる。将来的には、ネギ属植物のニラ (*A. tuberosum* Rottl.) で確認されているアポミクシス (Kojima and Nagato, 1992) をネギに導入して、ネギの F_1 採取方法の改善を図ることも望まれる。さらに、ニンニク、タマネギ、ラッキョウなどの他のネギ属植物で高機能性食品に関連する遺伝子が明らかになった場合、ネギの付加価値を高めるためには、これらの遺伝子を導入した新品種の育成が期待される。生物工学的手法はこれらの諸課題を解決するための有効な手段である。

従来、導入された異種染色体の有用遺伝子部分を作物ゲノムの染色体に組み込むためには、細胞遺伝学的手法や放射線照射による染色体の切断・融合によってなされてきた (Sharma and Knott, 1966). 最近、組織培養系を用いることによって、外来染色体の転座が招来されることが注目されている (Wang and Zhang, 1996). 従って、組織・細胞培養手法を用いることによって、遺伝的に安定した個体が従来の手法より比較的容易に得られるものと期待される。さらに、細胞培養系およびプロトプラスト培養系は温和な遺伝子の変異を誘発することから (廣近, 1999), これらの培養系の利用によってソマクローナル変異の利用も可能と考えられる。また、プロトプラスト融合は異種間での核および細胞質ゲノムの改変を可能にする技術であり (亀谷, 1998), 細胞質置換による細胞質雄性不稔系統 (F₁ 品種の母本) を短期間で育成することができる (Tanno-Suenaga et al., 1988 ; Akagi et al., 1995; Ando et al., 1997; Nikova et al., 1997; Rambaud et al., 1997). このように、ネギの組織培養系、細胞培養系、プロトプラスト培養系およびプロトプラスト融合法などの一連の生物工学的手法は、鳥取県のネギ品種の改良のみならず、今後のわが国のネギの育種にとって極めて重要な基礎技術になるものと考えられる。

体細胞雑種の育成に当たっては、安定して再現性のあるプロトプラストからの植物体再生系の確立が必須であるが、現在までのところ、ネギプロトプラストの培養系は報告されていない。これまでの知見によると、単子葉植物のイネ科作物では、分裂能を有するプロトプラストを単離するための材料として、唯一、培養細胞のみが有効とされる (Vasil and Vasil, 1992). これらの知見から、単子葉植物のユリ科に属するネギにおいても、培養細胞を素材としてプロトプラスト培養系の確立を検討することが適当と考えられる。

そこで本研究では、先ず第Ⅱ章においてネギの細胞培養系の確立を目指した。すなわち、‘伯州ネギ’を主な材料として、ネギのカルス誘導、細胞培養およびカルスからの植物体再生系の確立を目的とした。特に、均一な細胞集団を確保するためには、懸濁細胞培養系の開発が

重要である (作田,1999)。ネギ (*Allium fistulosum* L.) のカルス誘導および植物体再生系に関する研究については, 大澤ら (1981), Shahin and Kaneko(1986), Valk et al. (1992), Song and Peffley(1994), Karim and Adachi(1996)などいくつかの報告があるが, 懸濁細胞培養系の開発は Kim et al. (1996)の知見があるにすぎない。ネギ属植物に範囲を広げてみても, タマネギ (*A. cepa* L.), ニンニク (*A. sativa* L.) を主として, カルス誘導に関する多くの研究例 (Fridborg,1971; Havranek and Novak, 1973; Novak,1980,1981; Dolezel and Novak, 1985; Havel and Novak, 1988; 中島, 1989; 薜ら, 1991; 高儀ら, 1992; Valk et al., 1992; Karim and Adachi, 1996; Tanikawa et al, 1996; Matuda and Adachi, 1996; 高儀ら, 1996; Barandiaran et al., 1999) が報告されているものの, 懸濁細胞培養系については, リーキ (*A. ampeloprasum* L.) の Buiteveld et al.(1994) およびタマネギの Tanikawa et al. (1996) の 2 報告があるにすぎない。従って, ネギの懸濁細胞培養系に関する知見は充分とはいえないことから, ‘伯州ネギ’を材料として独自にその培養系を開発することが必要である。

第Ⅲ章では, ネギプロトプラストからの植物体再生系の確立を目的とした。Takebe et al. (1968) がタバコの葉肉組織から市販の酵素を利用してプロトプラストを大量に調製することに成功して以来, ネギ属植物においても当初からプロトプラストの単離に関する研究 (Otsuki and Takebe, 1969; Bawa and Torrey, 1971; Schnabl, 1980; 田代ら, 1984; 大澤・高柳, 1984) が精力的に進められた。さらに, その培養についても試みられてはいたが (Bawa and Torrey, 1971; 大澤・高柳, 1984; Feller, 1993), 1980年代においては, ネギ属植物のプロトプラスト培養の成功例はタマネギ (Wang et al.,1986)に限られ, その研究例は極めて少ないことが指摘されていた (Feller, 1993)。1990年代に入って, リーキ (Buiteveld and Creemers-Molenaar, 1994), タマネギ (Hansen et al.,1995) およびニンニク (Ayabe et al., 1995) のプロトプラストからの植物体再生系が相次いで報告されるに至った。しかし, ネギ属植物のプロトプラスト培養は依然として“recalcitrant”

であるとされ (Buiteveld and Creemers-Molenaar, 1994 ; Karim and Adachi, 1997), 現在に至るまで, ネギプロトプラストからの植物体再生系に関する成功例は報告されていない. 従って, ネギプロトプラストに好適な培養培地, 培養条件, および培養手法などの諸条件を明らかにすることが重要課題である.

第IV章では, ネギとタマネギとの電氣的プロトプラスト融合法の確立を目的とした. 植物のプロトプラスト融合は, 従来, ポリエチレングリコール(PEG) (Kao and Michayluk, 1974) やデキストラン硫酸 (Kameya, 1975) などを利用した化学的方法が用いられていたが, 近年は電気パルスによる方法が急速に発展し, 再現性があり融合効率が高いことから定法として利用されるに至った (野田・十川, 1989). ネギ属植物のプロトプラスト融合については既に Buiteveld et al. (1998) によってリーキ(*A. ampeloprasum*)とタマネギ(*A. cepa*)との体細胞雑種の育成が報告されているものの, 彼らのプロトプラスト融合はポリエチレングリコール (PEG) により行われており, 効率が高く再現性にすぐれているとは必ずしも言えない. そこで, 本研究ではネギ属植物で効率的で再現性のある電気融合条件を明らかにすることにした.

第V章では, 第III章および第IV章の知見を踏まえネギとタマネギとの体細胞雑種個体の育成を図った. また, 得られた植物体についてDNAレベルでその遺伝的同定を行った. ネギ属植物において, 過去20年の間にプロトプラスト融合技術の確立が検討された (Bracha and Sher, 1981; 田代ら, 1984) ものの, 体細胞雑種の獲得には至らなかった. 最近になって, Buiteveld et al. (1998) によってリーキ (*A. ampeloprasum* L.) とタマネギ (*A. cepa* L.) との体細胞雑種の開発が一例報告されているに過ぎない. ネギとタマネギとの体細胞雑種の育成技術は, ネギの生物工学的育種を推進するために必須のものである.

以上のように, 本研究は‘伯州ネギ’を素材として, 細胞培養系, プロトプラスト培養系, プロトプラスト融合法および体細胞雑種のための, 一連のネギ属植物に関するネギの生物工学的手法を開発することにより, 多様なネギ属植物の有用遺伝資源の利用を可能にし, ネギ

の育種，特に，鳥取県特産の‘伯州ネギ’の更なる品種改良に資するために行ったものである。

第Ⅱ章 ネギの懸濁細胞培養および植物体再生系の確立

ネギ属植物の細胞培養系の研究例は極めて限られていることから、本章では、鳥取県のネギ在来種の‘伯州ネギ’を素材として、カルスの誘導、懸濁細胞培養、および植物体再分化系の開発を扱う。さらに、懸濁細胞培養によって増殖した細胞からの植物体再生の安定性について評価する。

第1節 材料および方法

2-1-1. ネギ幼植物からのカルス誘導

ネギの幼植物を用いたカルス誘導試験では、‘改良伯州5号’（鳥取県白ネギ改良協会）および‘金長’（協和種苗）の2品種を用い、種子を無菌播種して得られた幼植物を材料とした。また、培地中のショ糖濃度について、0.1および0.2 Mの2処理区を設定して試験を実施した。

それぞれの種子は、約70% (v/v) のエタノール中で1分間洗浄し、続いて、有効塩素濃度5%のアンチホルミン（和光純薬）50 mlにツイーン20（Sigma）を2-3滴加えた滅菌液中で、種子を攪拌しながら1時間処理を行った。滅菌処理を完了した種子は滅菌水で3回洗浄を繰り返した。これらの種子は試験管（口径20 mm，長さ10 cm）中で固化したカルス誘導培地上に移植した。25℃暗黒下で2週間培養したのち、発芽した幼植物の茎盤部を含む長さ5 mm大の組織を切り取って新たな同一の培地に移植し、さらに1ヶ月培養を継続して形成されたカルス形成率を調査した。カルス誘導培地はBDS無機塩組成（Dunstan and Short, 1977）を基本とし、これに4.5 μ M 2,4-dichlorophenoxyacetic acid（以下、2,4-Dとする.），0.44 μ M 6-benzylaminopurine（以下、BAPとする.），1.0 g \cdot liter⁻¹ カザミノ酸（DIFCO），0.1または0.2 Mのショ糖，および0.2% ゲランガム（和光純薬）をそれぞれ添加し、pH 5.7に調整したものをを用いた。培地の滅菌はオートクレーブにより121℃，15分間処理で行った。

2-1-2. ネギ茎頂近傍組織からのカルス誘導

茎頂近傍組織からのカルス誘導試験は、‘改良伯州5号’および‘せなみ’（かねこ種苗）の2品種に加え、不抽苔性ネギ‘坊主しらず（ジャンボ系）’と同‘向小金系’（以上2系統は鳥取県園芸試験場弓浜砂丘地分場から分譲）の2系統を用いた。それぞれの品種または系統の茎頂近傍組織（茎頂を含む0.4–0.5 mm大）を実体顕微鏡下で切り取り、ショ糖濃度を0.1 Mとした上記のカルス誘導培地に置床した。培養1ヶ月後に形成されたカルスについて、大きさ別に分類しその数を計測した。

2-1-3. ネギカルスの懸濁細胞培養系の開発

カルスの液体培養試験では、‘改良伯州5号’の幼植物由来カルス（以下、幼植物カルス）および茎頂近傍組織由来カルス（以下、茎頂カルス）を供試した。液体培地はBDS無機塩組成を基本に、前述のカルス誘導培地で用いた1/2濃度の2,4-DとBAPを添加し、ショ糖濃度は0.1 Mとした。また、pH緩衝剤として20 mMの2(N-morpholino) ethanesulfonic acid（以下、MESとする）を加用した。その他の培地成分は上記のカルス誘導培地と同様とした。200 ml容量のガラス製培養フラスコに液体培地60 mlを注入し、これをオートクレーブで121℃、20分間の滅菌処理をしたものを用いた。150℃・2時間の高温乾燥滅菌処理をした1 mm角のステンレスメッシュ上で、幼植物および茎頂カルスを押しつぶして通過させ、圧縮細胞体積（50×gの遠心分離・3分間処理、以下PCVとする）として0.1ml量を液体培地に添加し、25℃、暗黒下、120回転/分の旋回培養を行った。培養開始後の3、7、および14日目に増殖したカルスのPCVを計測した。試験は幼植物および茎頂カルスとも3反復で実施した。

2-1-4. ネギカルスの懸濁細胞培養法の改善

上記で得られた‘改良伯州5号’と‘金長’のカルスを用い、3種の径のステンレスメッシュ上でカルスを細粒化し、液体培地とともに細胞塊を通過させたのち培養する方法を検討した。試験は0.5、1.0および2.0 mm角の乾熱滅菌

したステンレスメッシュ (Iida Manufacturing Co., LTD.) を通過させた細胞塊を液体培養し、培養 3, 7, 14 および 21 日目の PCV を測定した。培地および培養条件は試験 2-1-3 と同様とした。試験は品種ごとに 3 反復で実施した。

2-1-5. ネギの懸濁細胞培養培地の無機態窒素成分およびカザミノ酸の添加効果

BDS 培地に含まれる主要な無機態窒素成分である、25 mM 硝酸カリウムおよび 4 mM 硝酸アンモニウムの添加量を対照とし、これらを 0/4, 1/4, 2/4, および 3/4 に減じた培地を調製して細胞の増殖量を比較した。供試カルスは‘改良伯州 5 号’の幼植物カルスとし、1 mm のステンレスメッシュを用いて細粒化し、PCV として 0.1 ml 量の細胞塊を培養した。培養後 2 週間目に、それぞれの PCV を測定した。試験は 3 反復とした。

次に、培地中のカザミノ酸の添加量として、0, 100, 200, 400, および 800 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の 5 水準を設け、カルス増殖に対する効果を調査した。供試カルスは‘改良伯州 5 号’と‘金長’の幼植物カルスとした。試験は‘改良伯州 5 号’の場合は 4 反復、‘金長’の場合は 3 反復で行った。その他の培養条件および調査法は試験 2-1-3 と同様とした。

2-1-6. ネギの懸濁細胞培地中のシヨ糖濃度の効果

液体培地中のシヨ糖添加量について検討した。‘金長’のカルスを用いた試験では、0.05, 0.1, 0.2, 0.3, および 0.4 M の 5 水準のシヨ糖濃度を検討した。一方、‘改良伯州 5 号’の場合は、0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 および 0.6 M の 6 水準とした。試験は‘改良伯州 5 号’および‘金長’ともに 4 反復で行った。その他の培養条件および調査法は試験 2-1-3 と同様とした。それぞれの試験区で得られたカルスからプロトプラストを単離し、細胞の液胞化の程度を調査した。プロトプラスト中で液胞化している体積が 50% 未満のものを非液胞化細胞 (Non-vacuolated cell), 50% 以上のものを液胞化細胞 (Vacuolated cell) として顕微鏡下で評価した。観察したすべてのプロトプラスト中の液胞化プロト

プラストの割合を算出した。

カルスからのプロトプラストの単離は、3% (w/v) セルラーゼ・オノヅカ RS, 0.5% (w/v) マセロザイム R-200 (以上、ヤクルト本社), および 0.1% (w/v) ペクトリアーゼ Y-23 (Seishin Pharmaceutical Co.) の酵素組成で、0.6 M マニトール, 5 mM MES, CPW 無機塩 (Frearson et al., 1973), 0.1% (w/v) デキストラン硫酸をそれぞれ添加し、pH を 5.8 に調整した酵素液を用いた。酵素液は Steradisc 25 (0.2 μ m, クラボウ) を用いてフィルター滅菌した。

2-1-7. ネギ懸濁培養細胞からの植物体再生

2 mm 以上に発達した‘改良伯州 5 号’および‘金長’の懸濁培養細胞を供試し、植物体再生試験を行った。植物生長調節剤として 0 と 0.5 μ M の 2 水準の α -naphthaleneacetic acid (以下、NAA とする), 0.5, 1.0 および 5.0 μ M の 3 水準の BAP を組合わせ、合計 6 処理の試験区を設定した。基本培地は窒素分量を 1/2 とした MS 培地 (Murashige and Skoog, 1964) を用いた (以下、1/2N-MS 培地とする)。その他の培地成分として、1.0 g \cdot liter⁻¹ カザミノ酸, 10 mM MES, 0.22% (w/v) グランガム, 0.15 M ショ糖をそれぞれ添加した。また、培地の pH は 5.7 に調製した。培養は 25 $^{\circ}$ C, 14 時間の白色蛍光灯照明下 (20 μ mol \cdot m⁻² \cdot s⁻¹) で行った。

次に、セリンおよびカザミノ酸がネギカルスからの植物体再生に及ぼす効果について検討した。‘改良伯州 5 号’の液体培養カルスを供試し、20 mM L-セリンまたは 1.0 g \cdot liter⁻¹ のカザミノ酸をそれぞれ添加した培地と、これらが無添加とした対照培地で植物体の再生頻度を比較した。植物生長調節剤は 0.5 μ M NAA と 1.0 μ M BAP とをそれぞれ添加した。その他の培地組成および培養方法は上記の植物体再生試験と同様とした。

2-1-8. 継代培養回数を異にするネギ懸濁培養細胞からの植物体再生

ネギ液体培養カルスからの植物体再生の安定性を明らかにするため、3, 7, および 14 回の継代回数を経たカルスを用いて、植物体再生試験を行った。培

養 2 ヶ月後に、シュート形成の前組織である緑色粒状組織，あるいはシュートの形成が認められたカルスに分類し，そのカルス数を調査した．培地および培養方法は試験 2-1-7 に準じた．

第 2 節 結 果

2-2-1. ネギ幼植物からのカルス誘導

改良伯州 5 号’ および ‘金長’ の 2 品種のネギを用いて，幼植物茎盤部からのカルス誘導を検討した．その際，培地中のシヨ糖濃度として 0.1 および 0.2 M の 2 水準の試験区を設定した．その結果を Table 2-1. に示した．最終的には ‘改良伯州 5 号’ で置床した種子の 36.1～36.7 %，一方，‘金長’ では 29.7～50.0% の頻度でカルスが形成された．‘金長’ の 0.1 M シヨ糖区で 50% とカルス誘導率が比較的高かったが，その他の試験区では置床した種子の約 1/3 からカルスが形成された．

両品種とも，葉身下部の茎盤部が肥大したのち，その表面に白色ジェリー状または黄色粒状のカルスが形成された (Fig.2-1.)．黄色カルスの形成頻度はシヨ糖濃度 0.1 M より 0.2 M の試験区で高い傾向にあった．発芽した葉身または幼根からはカルスの発達は認められなかった．

2-2-2. ネギ茎頂近傍組織からのカルス誘導

‘改良伯州 5 号’ と ‘せなみ’ の 2 品種に加え，不抽苔性ネギ ‘坊主しらず (ジャンボ系)’ と同 (向小金系) の 4 栽培品種を供試し，これらの茎頂近傍組織からのカルス誘導を検討した．その結果を Table 2-2. に示した．供試した 4 栽培品種ともに，80%以上の頻度でカルスが誘導された．4 品種の間で詳細にみると，‘改良伯州 5 号’ および ‘坊主しらず (向小金系)’ の 2 栽培種では，置床した 24 個の茎頂中の 16 個 (66 %) 以上で，6 mm 径以上のカルスが形成された．一方，‘せなみ’ と ‘坊主しらず (ジャンボ系)’ は 6 mm 径以上のカルスを形成した割合は 4 % と少なかった．

Table 2-1. Effects of sucrose concentration on callus development in two cultivars of Japanese bunching onion.

Sucrose concentration (M)	Cultivar							
	Kairyohakushu 5 Gou				Kincho			
	No. of seeds inoculated (A)	No. of seeds germinated ^z	No. of tissues with calli ^y	Callus induction rate (B/A, %) ^x	No. of seeds inoculated (A)	No. of seeds germinated ^z	No. of tissues with calli ^y	Callus induction rate (B/A, %) ^x
0.1	30	28	11	36.7	36	29	18	50.0
0.2	36	29	13	36.1	37	34	11	29.7

^z Germinated seeds were counted after two weeks culture.

^y Tissues with calli were counted after a month culture.

^x Data were expressed as percentage.

Table 2-2. Comparison of callus induction from shoot tip tissue ^z in various cultivars of Japanese bunching onion.

Cultivar	No. of shoot tip tissues inoculated (A)	No. of shoot tip tissues with no callus	No. of shoot tip tissues with callus ^y				Callus induction rate (B/A) ^x
			Callus diameter		Total (B)		
			> 2 mm	2 - 4 mm		4 - 6 mm	
Kairyō-hakushu 5 Gou	24	2	0	6	16	22	91.6
Senami	24	4	4	4	1	20	83.3
Bouzusirazu (Jumbo)	24	1	2	9	11	23	95.8
Bouzusirazu (Mukaikogane)	24	1	0	6	17	23	95.8

^z Shoot meristem tissue (0.4 - 0.5 mm) including shoot apex.

^y Tissues with calli were counted after a month culture.

^x Data were expressed as percentage.

2-2-3. ネギカルスの液体培養法の開発

上述のように、ネギの幼植物あるいは茎頂近傍組織からのカルス誘導が可能となったので、‘改良伯州 5 号’の幼植物カルスと茎頂カルスを供試し、カルスの液体培養を検討した。両組織から誘導されたカルスを細粒化しないで液体培地中に注入し培養すると、カルスは分割せずに培養開始時よりもわずかに発達するに止まった。従って、カルスを液体培地に添加する際に、Tanikawa et al.(1996)に従って、ステンレスメッシュ上で押し潰して細粒化した。この方法で2種のカルスを液体培地に入れ、両者のカルス増殖量を3, 7および14日目に測定した。その結果を Fig. 2-2. に示した。幼植物カルスおよび茎頂カルスとも3日目で2.2倍, 7日目で3-4倍と両者の増殖量に大差がなかったが, 14日目では幼植物カルスは6.6倍, 一方, 茎頂カルスは10.1倍となり, 茎頂カルスの増殖率が高い傾向にあった。ただし, 反復間の誤差が多く t 検定 (5%水準) による両者の有意差は認められなかった。

2-2-4. ネギカルスの液体培養法の改善

‘改良伯州 5 号’と‘金長’の幼植物カルスを供試し, 3種のステンレスメッシュを用いて細粒化したカルスの増殖量を比較した。その結果を Fig. 2-3. に示した。

‘金長’の場合, 0.5 および 1.0 mm 径のメッシュを用いた細胞で増殖量が高く推移した。21日目の最終調査では0.5 mm 径が最大で6.4倍となり, 続いて1.0 mm の5.6倍, 2.0 mm の5.4倍の順となった。0.5 mm と2.0 mm 間の処理で統計的に有意な差(5%水準, 以下同)が検出されたが, 0.5 mm と1.0 mm 間では有意な差は認められなかった。一方, ‘改良伯州 5 号’の場合では, 1.0 mm 径のメッシュを用いた細胞の増殖量が他の2処理区よりも明らかに高く推移した。21日目の最終調査では, 1.0 mm 径が10.0倍と最大となったのに対し, 0.5 および2.0 mm 径では5.5倍前後に止まった。統計的にも1.0 mm 区と他の2区間で1% レベルの有意な差が検出された。

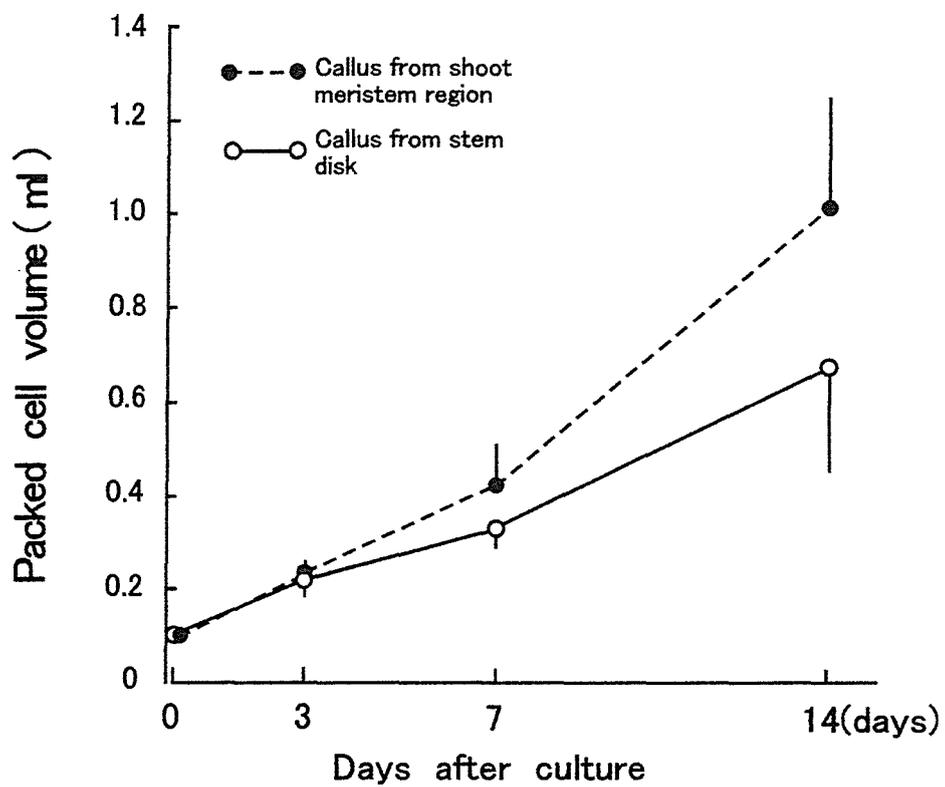


Fig. 2-2. Comparison of cell proliferation derived from two different tissues of Japanese bunching onion; n=3. Bartical bar in the figure indicates standard deviation.

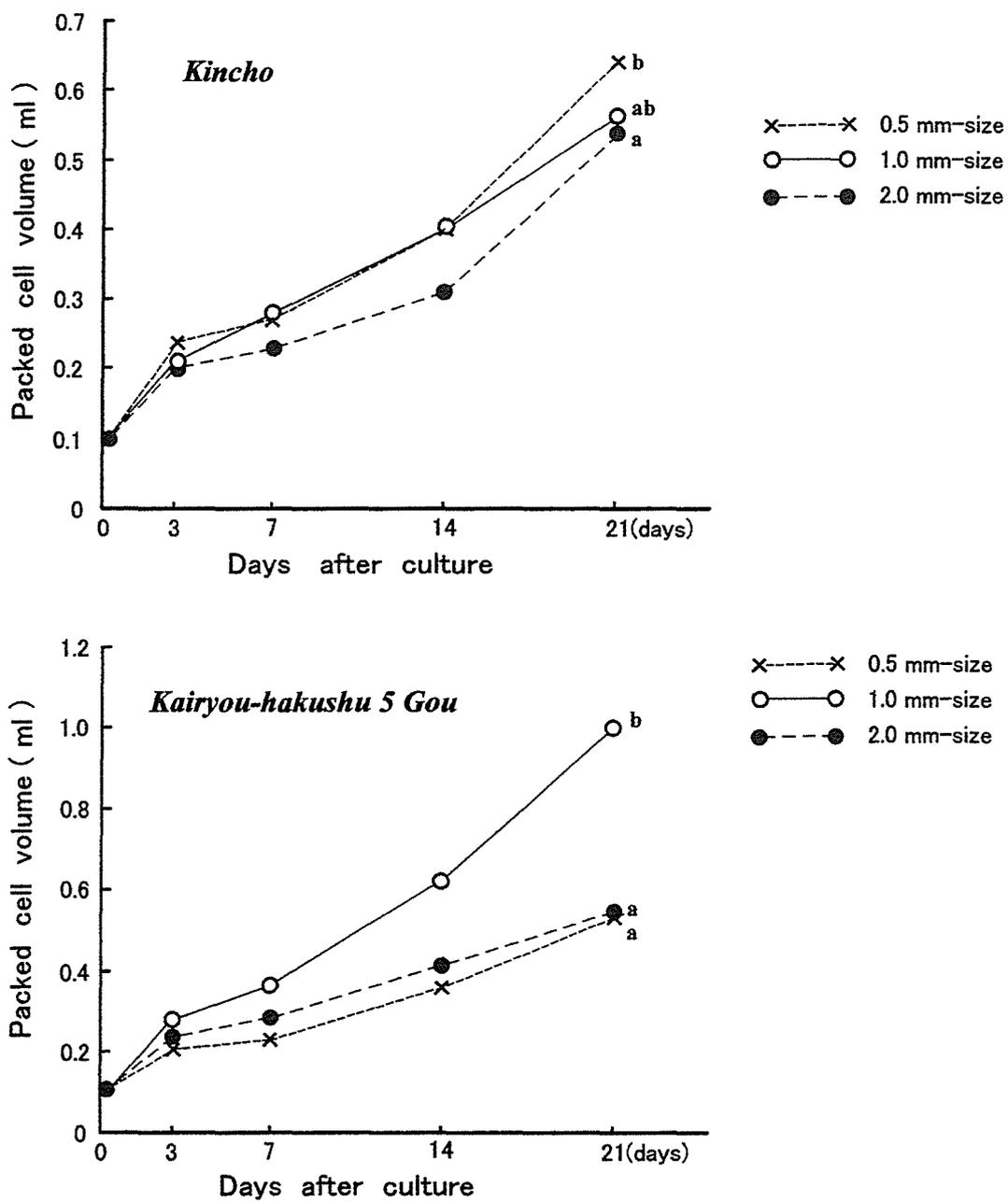


Fig. 2-3. Effects of cell partition through various size of stainless steel meshes on cell proliferation of Japanese bunching onion cv. 'Kairyoh-hakushu 5 Gou' and 'Kincho'; n=3. Different letters in the figure at a 21 days culture indicate significant differences at the 5 % level by Duncan's multiple range test.

2-2-5. ネギカルの液体培養培地の無機態窒素成分およびカザミノ酸の添加効果

液体培地の2種の成分がカルス増殖に及ぼす効果を検討した。BDS無機成分の中の窒素分量を原法の0/4, 1/4, 2/4, 3/4 および4/4とした培地を比較した(Fig. 2-4.)。その結果、窒素分量が多いほどカルスの増殖率が顕著に高く、BDS培地の原法である4/4の窒素分量では、2週間後には約16倍の増殖率となった。3/4, 2/4, および1/4に減じた窒素分量区では、カルス増殖量は4/4区のそれぞれ84, 74, および48%と少なかった。硝酸カリウムと硝酸アンモニウムを含まない0/4の培地ではカルスの増殖はほとんど認められず、4/4区の10%程度であった。

次に、培地中のカザミノ酸の添加効果を調査した(Table 2-3.)。‘改良伯州5号’では、0–800 mg·liter⁻¹区間のカルス増殖量は最大17.7倍、最小15.7倍と処理区間で大差がなかった。また、‘金長’の場合も同様で、カザミノ酸無添加の4.1倍が他処理区よりも低い傾向があるが、100–400mg·liter⁻¹間では4.8–5.2倍となり統計的にも有意差はなかった。

2-2-6. ネギカルの液体培養培地中のシヨ糖濃度の効果

液体培地中の最適なシヨ糖濃度を明らかにする目的で、種々の濃度のシヨ糖を添加し、カルスの増殖量を比較した。また、増殖したカルスからプロトプラストを単離して、液胞が少なく細胞質に富んだ細胞(Non-vacuolated cell, 以下NV細胞とする)の割合を調査した(Fig. 2-5.)。その結果をFig. 2-6.に示した。‘金長’では、0.1および0.2 Mのシヨ糖濃度でカルス増殖量が5倍前後と高く、他のシヨ糖濃度区と統計的にも有意な差であった。カルス増殖量にNV細胞の割合を乗じたカルス量を算出すると、0.2 Mのシヨ糖濃度で最大となり、続いて0.1, 0.3, 0.05 および0.4 Mの順となった。‘改良伯州5号’では、0.05と0.1 Mのシヨ糖濃度でカルス増殖量が有意に多く、17倍以上であった。NV細胞量をみると、‘金長’と同様に0.2 Mで最大となった。

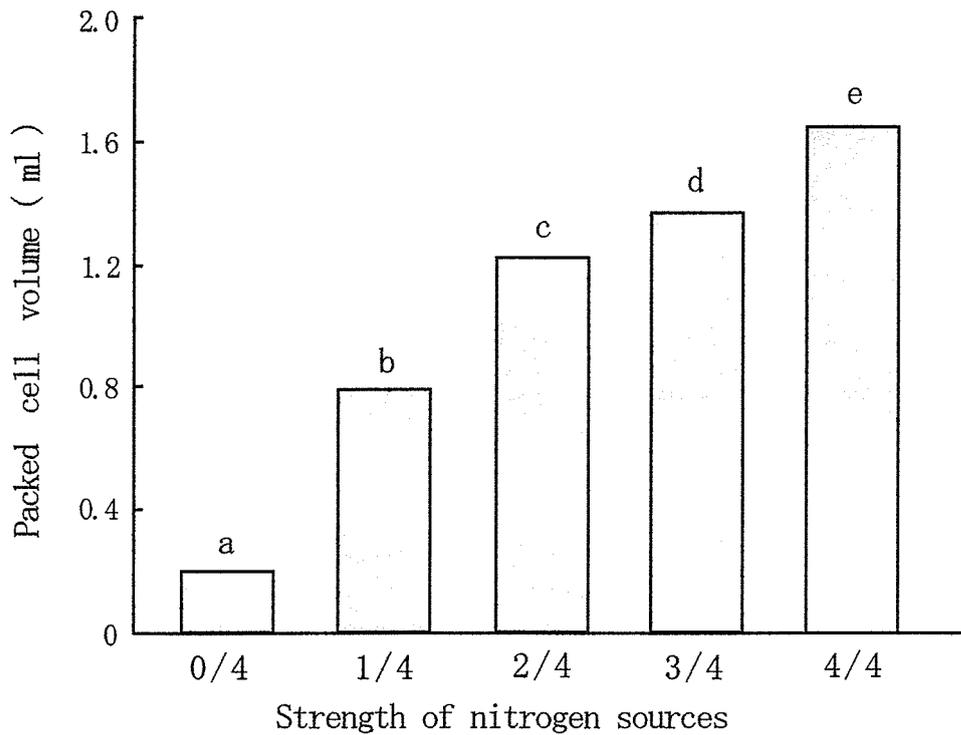


Fig. 2-4. Effects of nitrogen sources in liquid medium on callus development of Japanese bunching onion 2 weeks after incubation; n=3. 4/4 strength of nitrogen sources indicate that BDS-original nitrogen sources presented by Dunstan and Short (1977) were contained. Different letters on the column indicate significant differences at the 5 % level by Duncan's multiple range test.

Table 2-3. Effects of casamino acids in liquid medium on callus development of Japanese bunching onion .

Concentration of Casamino acids (mg/liter)	Packed cell volume (ml) ^z	
	Kairyō-hakushu 5 Gou	Kincho
0	1.68 ab	0.41 a
100	1.72 ab	0.51 b
200	1.57 a	0.52 b
400	1.66 ab	0.48 b
800	1.77 b	n.t. ^y

^z Packed cell volume was investigated after 2 weeks incubation. Kairyō-hakushu 5 gou; n=4, Kincho; n=3. Different letters in the identical column indicate significant differences at the 5 % level by Duncan's multiple range test.

^y not tested.

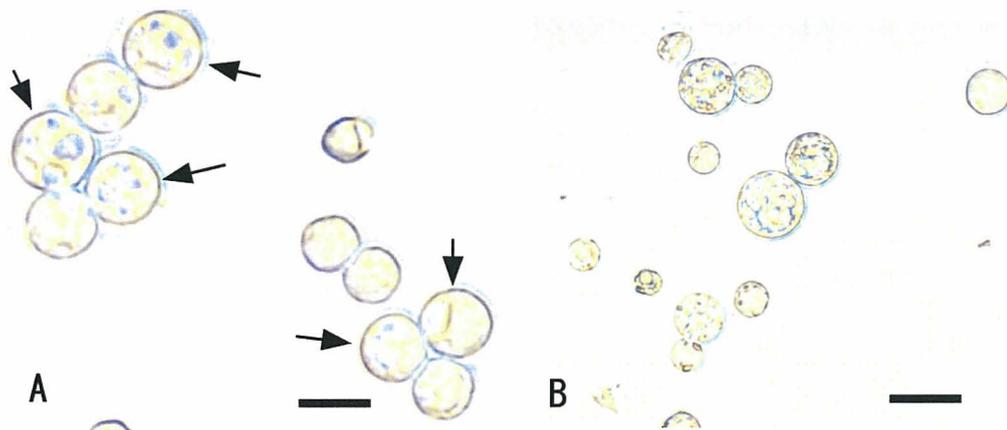


Fig.2-5. Appearance of vacuolated and non-vacuolated protoplasts. photograph A and B show the protoplasts isolated from the cultures in 0.05 M and 0.2 M sucrose-containing medium, respectively. Arrow in the photographs indicates vacuolated protoplast. Vertical bar shows 50 μm .

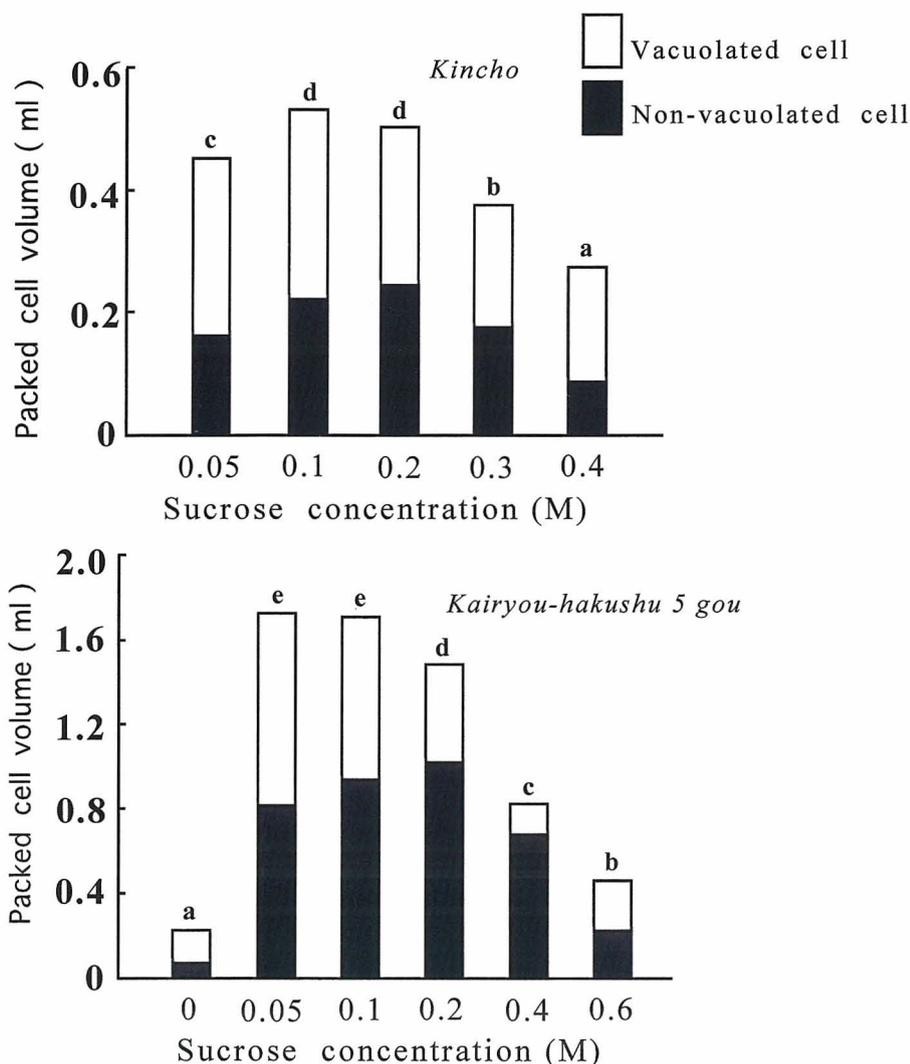


Fig.2-6. Effects of sucrose concentration in liquid medium on cell proliferation and vacuolation of Japanese bunching onion; n=4. Different letters on the column indicate significant differences at the 5 % level by Duncan's multiple range test.

2-2-7. ネギ液体培養カルスからの植物体再生

カルスからの植物体再生をはかるために、種々の濃度の NAA と BAP を組合わせた再分化培地を比較した。その結果を Table 2-4. に示した。‘金長’の再分化率は最大値 51.5 %、最小値 12.0 % であったのに対し、‘改良伯州 5 号’は最大値 26.7 %、最小値 0.0 % と前者に対して明らかに低かった。NAA と BAP の組合わせをみると、‘金長’では 0.5 μ M NAA と 1.0 μ M BAP、または、5.0 μ M BAP 単独添加の処理区で 50 % 以上の再分化率となった。一方、‘改良伯州 5 号’では‘金長’と同じく、0.5 μ M NAA と 1.0 μ M BAP の組合わせで 26.7% の植物体再生率と最大となった。続いて、0.5 μ M BAP 単独添加区の 20.0 % であった。他の組合わせでは 11.8 % 以下と再生率が低かった。再分化した植物の形態をみると、5.0 μ M BAP を含む培地で発達したシュートはねじれや生育停滞などが 1.0 μ M BAP のそれに比べて多い傾向があった。

ネギの再分化にたいするアミノ酸の効果を調査した。その結果を Table 2-5. に示した。再分化培地にアミノ酸を添加しない場合、置床した 64 個のカルスのうち 28 個のカルス (43.8 %) からシュートが再生した。カザミノ酸を 1.0 g \cdot l⁻¹ 添加すると 64 個中の 34 個 (53.1 %) と対照区によりも 10% 程度の向上が認められた。これとは対照的にセリン添加では、64 個中で再分化したカルスは 9 個 (14.1 %) と対照区の半分以下の再分化率となり、再分化が明らかに抑制された。

2-2-8. 継代培養回数を異にするネギ液体培養カルスからの植物体再生

継代培養回数異なる‘改良伯州 5 号’のカルスを供試し、植物体の再生頻度を調査した (Fig.2-7)。7 代以下の継代培養回数では置床したカルスの 70 % 前後で植物体の再生が認められた。一方、14 代目では 30 % 程度の頻度で緑色粒状組織の発達は認められたが、植物体の再生は観察されなかった。14 代を経たカルスは 2 ヶ月以降培養を継続しても、緑色粒状組織からの植物体再生はほとんど認められなかった。

Table 2-4. Effects of growth regulators on plant regeneration from cell suspension cultures of two cultivars in Japanese bunching onion.

Growth regulators ^z (μ M)		Kairyō-hakushu 5 Gou			Kincho		
NAA	BAP	No. of calli Inoculated ^y (A)	No. of calli regenerated ^x (B)	Frequency (B/A, %)	No. of calli Inoculated ^y (A)	No. of calli regenerated ^x (B)	Frequency (B/A, %)
0	0.5	17	3	20.0	27	10	37.0
0	1.0	18	0	0.0	30	10	33.3
0	5.0	13	1	7.7	32	16	50.0
0.5	0.5	17	2	11.8	25	9	36.0
0.5	1.0	15	4	26.7	29	15	51.7
0.5	5.0	13	1	7.7	25	3	12.0

^z NAA; α -naphthaleneacetic acid, BAP; 6-benzylaminopurine.

^y Above 2 mm callus in diameter was used.

^x Plant regeneration was investigated 2 months after culture.

Table 2-5. Effects of amino acids on plant regeneration from cell suspension cultures of Japanese bunching onion.

Type of Amino acids ^z	No. of calli inoculated ^y (A)	No. of calli regenerated ^x (B)	Frequency (B/A, %)
Control	64	28	43.8
Serine	64	9	14.1
Casamino acids	64	34	53.1

^z 20 mM L-serine and 1.0 g · l⁻¹ casamino acids were tested.

^y Above 2 mm callus in diameter was used.

^x Plant regeneration was investigated 2 months after culture.

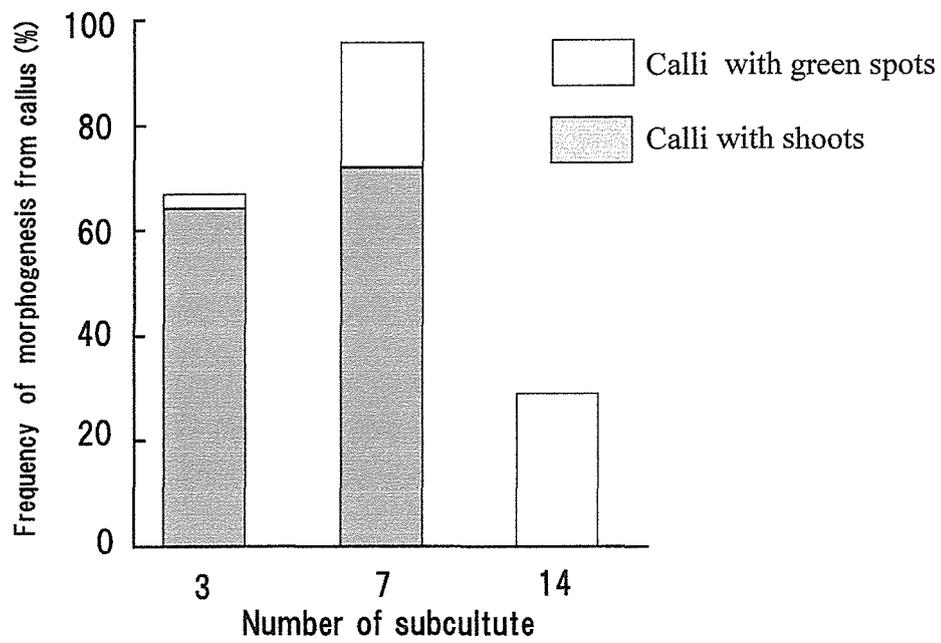


Fig. 2-7. Degradation of redifferentiation ability during subculture of callus. Calli were subcultured at a 2 weeks interval. Plant regeneration was investigated after a two-month culture.

第3節 考 察

本章では、供試品種として‘改良伯州5号’を主として用いた他、‘金長’、‘せなみ’、‘坊主しらず’（ジャンボ系）および同（向小金系）を扱った。‘金長’を除いたいずれの品種とも、鳥取県下で栽培されている優良品種である。

‘改良伯州5号’は、1985年に当時の鳥取県野菜試験場西伯分場で在来の‘伯州ネギ’から選抜され、鳥取県西部地域で普及している品種である（近藤・中原, 1997.）。また、‘改良伯州5号’と同様の千住系で黒柄品種‘金長’も対照として併せて試験材料として扱うこととした。‘坊主しらず’は5月中旬から下旬にかけて収穫される不抽苔性のネギ品種である。本品種は株分けにより長年にわたって選抜され成立した品種と考えられるが、抽苔開花を促進するためには、明期 25℃—暗期 2℃の温度較差の激しい処理を設けることが必要とされる（桑田・成川, 2001.）。従って、自然条件下では交雑による新品種の開発は制限されている。この点を克服する手法として、交雑によらない細胞選抜や細胞融合などの新育種技術の適用が有効と考えられることから、供試材料として併せて用いることとした。

ネギのカルスを誘導するための外植体として、幼植物茎盤部と茎頂近傍組織との2種の組織を材料とした。その結果、幼植物茎盤部からは30—50%の頻度で、また、茎頂近傍組織からは80%以上の頻度でカルスが誘導され、茎頂近傍組織からのカルス形成頻度は幼植物茎盤部の約2倍と高かった。しかし、茎頂の摘出は熟練を要し極めて煩雑である。また、これを利用するとなると栄養生長期の材料に限定される。一方、種子由来の幼植物は、大量に扱うことが可能であること、その操作が容易であること、年間を通じて随時利用できることなどの有利な点があることから、種子由来の幼植物を外植体とすることが、実験の遂行上では適当と判断された。ネギおよびタマネギを対象としたカルス誘導は、これらの理由により無菌は種した幼植物を材料とする報告が多い

(Shahin and Kaneko, 1986; 中島, 1989; 高儀ら, 1992; Valk et al., 1992; Song and Peffley, 1994; Karim and Adachi, 1996; Tanikawa et al., 1996; Matsuda and Adachi, 1996; 高儀ら, 1996)。

イネ科植物の培養細胞の分化能を維持するためには *embryogenic callus* の誘導が必須とされ、黄白色で細かい粒状をしたカルスが利用される (小関・小沢, 1998). ネギ属植物においても, 多くの例で *embryogenic callus* の誘導とその培養が行われている (Shahin and Kaneko, 1986; Havel and Novak, 1988; 中島, 1989; 薜ら, 1991; Valk et al., 1992; Song and Peffley, 1994; Buiteveld et al, 1994; Karim and Adachi, 1996; Matuda and Adachi, 1996; Baran-diaran et al., 1999). 本試験においてもこれらの知見を踏まえて, *embryogenic callus* の誘導を検討した. すなわち, 培地中のシヨ糖濃度を 0.1 および 0.2 M の 2 段階として浸透圧による *embryogenic callus* の選抜を試みた. その結果, ‘金長’ の場合では, 0.2 M のシヨ糖を添加したカルス誘導率は 0.1 M のその約 1/2 に低下するが, 供試した 2 品種とも *embryogenic callus* の形成率は 0.2 M のシヨ糖濃度区で多い傾向が観察され, *embryogenic callus* の浸透圧は非 *embryogenic callus* に比べて高いことが示唆された.

ネギ属植物を対象とした懸濁細胞培養を行う場合, リーキの例 (Buiteveld et al. 1994) を除いて, カルスは自然には細粒化しないことから, 1 mm 径のステンレスメッシュを用いてカルスを人為的に細粒化し培養することを試みた (Tanikawa et al., 1996). その際, 幼植物カルスと茎頂カルスを供試した. その結果, この方法によってネギの懸濁細胞培養系の開発が可能であることが明らかとなった. また, 幼植物カルスと茎頂カルスとは, 増殖率に大差がなく形態的にも *embryogenic callus* とみられることから, 両者の質的な相違はないものと考えられた (Fig. 2-2.).

上記の試験を踏まえ, 3 種の径のステンレスメッシュを用いて, カルスの増殖率を調査した. ‘改良伯州 5 号’ では, 1.0 mm 径の場合に増殖率が明らかに高く推移した. 一方, ‘金長’ では 0.5 と 1.0 mm 区が 2 mm 区よりも増殖が優れた (Fig.2-3.). この結果から, ネギの懸濁細胞培養を行うに際しては, 1.0 mm 径のステンレスメッシュを用いて細粒化することが適当と考えられた.

ネギ属植物では, これまで懸濁細胞培養のための培地組成について詳細な検討がなされていない. 従って, BDS 培地を基礎として培地中に多量に含有される無機態窒素成分量について試験を行った. また, ネギの茎頂培養ではアミ

ノ酸の添加効果が高いことが示されていることから（下中・鷹見，1991），カザミノ酸の効果についても検討した．その結果，無機態窒素成分は BDS の原法が最も細胞の増殖率が高く，その分量を減じると細胞の増殖率は顕著に低下した（Fig. 2-4.）．従って，無機態窒素分量は BDS の処方が適当と考えられた．カザミノ酸の添加試験では，‘改良伯州 5 号’の場合顕著な効果は認められなかった．一方，‘金長’は $100 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 以上で細胞の増殖率が高かった．すなわち，カザミノ酸はネギ細胞の増殖に対して阻害的には働かないこと，また，‘金長’では $100 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ 以上では細胞の増殖率が高いことが示されたので（Table 2-3.）， $200 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ の添加量にすることとした．

前試験で，embryogenic 細胞はその浸透圧が高いことが示唆されたので，懸濁細胞中で embryogenic 細胞の増殖を促進するために，液体培地中のシヨ糖濃度を検討した．その際に，小関と小沢(1998)の知見を基に，得られた細胞をプロトプラスト化して，細胞質に富み液胞化していない細胞の割合を調査した（Fig. 2-5.）．その結果，細胞の増殖率は， $0.05 - 0.2 \text{ M}$ のシヨ糖濃度で高いが，NV 細胞の増殖率は‘改良伯州 5 号’および‘金長’ともに， 0.2 M で高かった（Fig. 2-6.）．従って，ネギの懸濁細胞培養では， 0.2 M のシヨ糖添加が適当と考えられた．

以上の一連の試験で，ネギの懸濁細胞培養系が確立したと考えられたので，これらの細胞を供試して植物体の再生試験を行った．また，継代培養期間が長いと再分化能の低下が指摘されていることから（Buiteveld et al., 1994; Tanikawa et al., 1996），継代培養回数の異なる細胞を用いて，植物体の再生試験を行った．

植物体の再生試験では，オーキシンとして NAA，サイトカイニンとして BAP を採用し，その濃度を組み合わせて検討した．その結果，両品種共通に $0.5 \mu \text{ M}$ NAA と $1.0 \mu \text{ M}$ BAP の組み合わせで植物体再分化率が高く，これらの濃度が適当と考えられた．また，品種間差が認められ‘改良伯州 5 号’の植物体再生率は最高値 27%と，‘金長’の半分程度に止まった（Table 2-4.）．Karim and Adachi (1996) は，3 品種のネギカルスからの植物体再分化を検討した結果， $1.0 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ のカイネチン単独添加の場合，植物体再生率は 24%であったが， $0.26 \text{ mg} \cdot \text{liter}^{-1}$ のアブシジン酸（ABA）の併用によってその率は 44%と著し

く向上したことを認めている。本試験においても再分化率をさらに向上させるためには、ABAの併用を検討する必要がある。

下中・鷹見(1991)は、ネギの茎頂培養に際してカザミノ酸の添加効果が高いことを認め、その効果はセリンまたはトレオニンによることを明らかにしている。ネギカルスからの植物体再生においてもカザミノ酸の効果が認められ、無添加に比べて10%程度再分化率が向上した。これに反してセリンの添加では再分化率は無添加の1/2以下となり、セリン添加により再分化が明らかに阻害された(Table 2-5.)。加藤ら(1983)は、タマネギの葉鞘および葉身にはグルタミンをはじめ、グルタミン酸、セリン、アラニンなどのアミノ酸が集積することを明らかにしている。これらのアミノ酸は植物の生長に寄与すると考えられるが、カルスからの植物体再生に関しては、セリン以外のアミノ酸の関与が推定される。

継代培養回数が3, 7および14回の懸濁培養細胞を供試して、植物体再生試験を行った。その結果、7代目以内の継代培養では70%前後の再分化率となったが、14代目では植物体の再生はほとんど認められなかった(Table 2-7.)。この結果から、懸濁細胞の育種的利用にあたっては植物体再生が必須条件であるので、継代回数が7代(期間としては4ヶ月)を超過した懸濁培養細胞の利用は回避すべきものと判断された。この現象はネギ属植物においては一般に認知されている(Shahin and Kaneko, 1986; Buiteveld et al., 1994; Tanikawa et al., 1996)。また、従来から細胞学的な調査が詳細に行われている。Novak(1981)はニンニクのカルス培養において継代培養回数が増えると2倍体細胞が減少し、倍数体および異数体細胞の出現頻度が高くなることを報告している。また、Dolezel and Novak(1985)は、2,4-Dなどの植物生長調節剤の添加によって染色体が不安定となると指摘している。逆に、これらの温和に変異誘起された細胞を利用して、有用なカリクローン植物育成への可能性も指摘されているので(Novak et al., 1986)、不抽苔性ネギ品種‘坊主しらず’への応用が期待される。

以上のような一連の試験で、ネギのカルス誘導、懸濁細胞培養系および植物体再生系などが確立されたものと考えられる。懸濁細胞培養による変異の検討については、今後の課題として残されたが、変異をなるべく少なくするための

細胞の培養条件，培養期間などを明らかとすることができた。

本培養系の開発は，次章で扱うプロトプラストの調製および培養のために資するものと考えられる。

第4節 摘要

本章では，‘改良伯州 5 号’を中心品種として，安定して再現性のあるネギの脱分化－再分化系の開発を検討した。その中で，均一な細胞集団を得るために，懸濁細胞培養系の技術確立を目指した。得られた知見は以下のとおりである。

(1) ネギのカルス誘導は、幼植物茎盤部あるいは茎頂近傍組織を外植体とし、0.2 M のショ糖を添加した 2,4-D を含む BDS 培地が適当であった。種子が得られる品種では，種子からの幼植物体を外植体として利用することが実用上有利と考えられた。

(2) ネギの懸濁細胞培養を行うためには，1 mm 径のステンレスメッシュを用いて，細胞を細粒化することが必須であった。

(3) ネギ懸濁細胞培養のための培地は BDS 培地が適当で，200 mg · liter⁻¹ のカザミノ酸を添加することが適当と考えられた。また，ショ糖濃度を 0.2 M とすると細胞質に富み液胞化していない細胞の増殖率が高かった。

(4) 懸濁培養細胞からの植物体再生は，0.5 μM NAA と 1.0 μM BAP の組み合わせで植物体再分化率が高かった。また，植物体再生に対するカザミノ酸の添加効果が認められた。

(5) ネギの懸濁培養細胞からの植物体再生率は，7 代目以内の継代培養回数であると 70%程度が維持されていたが，14 代目では植物体の再生は認められなかった。

第三章 ネギプロトプラスト培養法の確立

本章では、前章で確立したネギの懸濁培養細胞を材料としてプロトプラストの単離を行い、ネギプロトプラストからの再現性のある植物体再生系の開発を目的として、ネギのプロトプラスト培養に好適な培地成分、培養手法、および植物体の再生法に関する諸条件の探索を行った。

第1節 材料および方法

3-1-1. ネギ懸濁培養細胞からのプロトプラストの単離

前章で確立したネギの懸濁培養細胞を用いて、酵素的にプロトプラストを単離することを検討した。試験は酵素液中の好適な浸透圧を検索することを目的として、マニトール濃度を 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 および 0.8 M の 5 水準を設定し、プロトプラスト収量およびプロトプラストの活性を調査した。供試材料は‘金長’の幼植物カルスを起源とする懸濁培養細胞（継代培養後 2 週間目の細胞）を用いた。約 500 mg の細胞を 10 ml の酵素液に入れ、28℃、4 時間の往復振とう（60 strokes · min⁻¹）処理を行った。酵素液組成は上記の 5 水準のマニトール濃度に、3 % Cellulase “ONOZUKA”（ヤクルト本社）、0.5 % Macerozyme R-200（同）および 0.1 % Pectlyase Y-23（盛進製薬）の酵素をそれぞれ添加し、その他に、5 mM MES および CPW 無機塩（Frearson et al., 1973）および 0.1% デキストラン硫酸を加え、pH は 5.8 とした。酵素処理を終えた細胞は 50 μm のナイロンメッシュで濾過し、酵素を含まないそれぞれのマニトール濃度の洗浄液を添加し、60 × g、3 分間の遠心処理を 3 回繰り返してプロトプラストを洗浄した。フックスーロゼンタール血球計算盤（エルマ社）でプロトプラスト数を計測し、細胞 1.0 g FW 当たりのプロトプラスト収量を算出した。また、フルオレセイン二酢酸（FDA）で染色して、プロトプラストの活性（Larkin, 1976）を調査した。さらに、Nagata and Takebe (1970) の方法に従い、Calcofluor により染色して細胞壁の消化状況を確認した。酵素液およびプロトプラスト培養培地は Steradisc 25 (0.2 μm, クラボウ) を用いてフ

フィルター滅菌した。

これらの試験は3反復で実施した。以下、特に記述しない限り試験は3反復以上で実施し、Duncanの多重検定法により5%水準で処理区間の有意性検定を行った。

3-1-2. プロトプラストの分離・精製のための遠心分離条件

細胞壁を持たないプロトプラストは物理的衝撃に弱いことから、プロトプラストの洗浄・精製のための遠心分離条件について検討した。供試材料は継代培養回数が10代を超えない‘改良伯州5号’の懸濁培養細胞を用いた（以下、特に記述しない限り同様の材料を用いた）。酵素処理を終えた細胞は上記と同様にナイロンメッシュで濾過し、30, 60, 120, 240 および 480 × g の遠心分離を3回繰り返す、プロトプラストを分離精製した。なお、酵素液と洗浄液中のマニトール濃度は0.63 Mとした。各処理により得られたプロトプラストはその収量を算出するとともに、プロトプラストを 2.0×10^5 個・ ml^{-1} に調整し、60×15mmの滅菌プラスチックシャーレに2.5 ml量を注入して25℃・暗黒下で培養を行い（以下、特に記述しない限り同様の方法で培養した）、培養開始後10日目の初期細胞分裂率を倒立顕微鏡下で調査した（以下、特に記述しない限り同様の調査を行った）。

3-1-3. プロトプラスト培養のための好適培地条件の探索

(1) 無機塩類組成

BDS無機塩組成のなかで含有量が多い硝酸カリウム(KNO_3)および硝酸アンモニウム(NH_4NO_3)の濃度を検討した。すなわち、BDS原法である25 mM KNO_3 と4 mM NH_4NO_3 の処方濃度を5/5とし、その濃度を4/5, 3/5, 2/5, 1/5 および無添加(0/5)に減じた処方プロトプラスト培養を行った。

上記の試験を受け、次に培地中の KNO_3 の濃度について、0, 5, 10, 15, および20 mMの5水準を設定して、プロトプラストの培養試験を行った。また、 KNO_3 の代替として硝酸イオンを一定（硝酸ナトリウム5 mM添加）と

し、KCl を 0–20mM の範囲で 5 水準設定して、プロトプラストの培養試験を行った。

培地中の硫酸イオンはイオウ原子を含んでおり、これらが代謝されてアリインまたはアリシンなどの含硫化合物が生成され、その結果、細胞分裂を阻害する要因となることが推察されている (Feller, 1993)。このことを確認するために、BDS 培地に含まれる硫酸アンモニウム ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) および硫酸マグネシウム (MgSO_4) を対照として、これらの硫酸イオンを塩素イオンに置換した塩化アンモニウム (NH_4Cl) と塩化マグネシウム (MgCl_2) を添加してプロトプラスト培養を行った。調査は培養後 45 日目のコロニー形成数を肉眼により計測した。

(2) 植物生長調節剤

ネギプロトプラストの発達を誘起するため、オーキシシンとして 2,4-D (0–5 μM)、サイトカイニンとして BAP (0–5 μM) を採用し、これらの好適な濃度組合わせを検索した。培養は 6 × 4 穴のマイクロプレート (コーニング社) を利用し、所定濃度の植物生長調節剤で 1.5×10^5 個 $\cdot \text{m l}^{-1}$ に調整したプロトプラスト懸濁液 200 μl を注入して培養した。試験は 2 反復で行った。

(3) 糖組成

培地中のシヨ糖濃度を 0.40, 0.45, 0.50, 0.55 および 0.60 M の 6 水準設定し、これらを含む培養培地の浸透圧をオスモメーター (フォーゲル社) により測定するとともに、これらの培地にプロトプラストを 1.0×10^5 個 $\cdot \text{m l}^{-1}$ の細胞密度になるよう懸濁して培養を行った。

次に、培地中のシヨ糖とブドウ糖の濃度比を 0:4, 1:3, 2:2, 3:1 および 4:0 とした 5 種の糖組成でプロトプラストの培養を行った。なお、培地の浸透圧はマニトールを添加して共通に $0.61 \text{ osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ に調整した (以下、培地の浸透圧は同様とした)。

さらに、シヨ糖とブドウ糖の添加濃度をそれぞれ 0.2 M として、これに加えて果糖濃度として 0, 0.05 および 0.10 M の 3 水準を設定してプロトプラスト培養を行った。

(4) ビタミン組成

培地中のビタミン類として、B5 (Gamborg et al., 1968), TM-2 (Shahin, 1985) および 8P(Kao et al., 1975) の3種の処方を供試してプロトプラスト培養を行った。

(5) その他の有機化合物

上記のビタミンの他、イノシトール、システインおよびアスコルビン酸の添加濃度をそれぞれ検討した。イノシトールは0, 100, 400, 1600, 4600 および 6400 mg · ml⁻¹の6水準で、システインは0, 1, 2, 4, および 8 mM の5水準で、また、アスコルビン酸は0, 1, 2, および 4 mM の4水準で試験を行った。なお、イノシトールの試験に限り、‘早どり伯州’の幼植物カルスを起源とする懸濁培養細胞を用いた。培養後 35-40 日目に形成されたコロニー数を肉眼により計測した。

3-1-4. その他の培養条件

(1) 照度条件

プロトプラスト培養器の上方に蛍光灯 (National FL40SS · EX-N/37) を設置し 16 時間照明とした。この条件下で、50%遮光率の黒寒冷紗を無被覆(2,870 lux), 一重被覆 (1,540 lux), 二重被覆 (840 lux)とした処理に加えて、アルミホイル被覆 (暗黒) の4処理区を設置し、それぞれの照度条件下でプロトプラスト培養を行った。培養後 34 日目に、形成されたコロニー数を肉眼により計測した。

(2) ナース細胞の添加効果

3 cm の滅菌プラスチックシャーレに 1.5 ml のプロトプラスト懸濁液を注入し、これに 1.5-2.0 mm 径の細胞塊を 0, 2, 5, 10 および 20 個添加して培養を行った。次に、ナース細胞無添加を対照とし、3個のナース細胞を添加した培地の浸透圧の推移を培養 10 日までの間に2日間隔で測定した。また、培養後 10 日目の培地中のブドウ糖濃度をグルコースオキシダーゼ法(田村, 1983)

により測定した。

3-1-5. ネギプロトプラスト由来カルスからの植物体再生

ネギプロトプラストを培養して約1月後に、得られたコロニーをカルス誘導培地（第II章）に移植し2週間培養した。2 mm以上に発達したカルスは再分化培地（第II章）を注入固化した試験管（口径 20 mm, 長さ 100 mm）に移植し、16時間照明（約 2,500 lux）、25°Cの条件で培養した。試験は、再分化培地中のショ糖濃度について、0.10, 0.15, 0.20, 0.25 および 0.30 Mの5水準を設定して、培養2ヵ月後の植物体再生頻度を比較した。

第3節 結果

3-2-1. ネギ懸濁培養細胞からのプロトプラストの単離

前章で確立したネギの懸濁培養細胞を材料として、3% Cellulase “ONOZUKA” RS, 0.5% Macerozyme R-200 および Pectlyase Y-23 の酵素組成でプロトプラストの単離を検討した。その際に、酵素液中の好適な浸透圧を検索するために、マニトール濃度として5水準設定して試験を行った。その結果を Table 3-1. に示した。検討したマニトールの範囲では、 $5.4-9.6 \times 10^6$ 個・ 1gFW^{-1} と多くのプロトプラストが単離された。その中でも、0.4 Mのマニトールを含む酵素液で 9.6×10^6 個・ 1gFW^{-1} と最高プロトプラスト収量が得られた。低濃度のマニトール濃度でプロトプラスト収量が多い傾向があった。マニトール濃度が 0.7 M 以上になると、プロトプラスト収量は 6×10^6 個・ 1gFW^{-1} 未満となり、0.4 M 区の収量の 60% 以下となった。FDA 染色によりプロトプラストの活性を調査した結果、0.6 M 区で最高値の 94.9% となり、本条件下ではほとんどのプロトプラストが FDA で染色された (Fig. 3-1.)。一方、プロトプラスト収量が多かった 0.4 M 区は 78.7% と最低の FDA 染色率であった。プロトプラスト収量と対照的に、マニトール濃度が高いほど FDA で染色される割合が多い傾向にあった。

Table 3-1. Effects of mannitol concentration on yield and viability of protoplasts derived from suspension cultures of Japanese bunching onion cv. 'Kairyuu-Hakushu 5 Gou' ^z.

Mannitol Concentration (M)	Protoplast yield ($\times 10^6 \cdot 1 \text{ gFW}^{-1}$)	Protoplast viability ^y (%)
0.4	9.6 a	78.7 a
0.5	7.4 b	88.3 b
0.6	7.5 b	94.9 c
0.7	5.8 c	89.7 b
0.8	5.4 c	91.5 bc

^z Different letters in the same column represent significant differences by Duncan's multiple range test at 5 % level (n=3).

^y Protoplast viability was assessed by staining with fluorescent diacetate (Larkin, 1976).

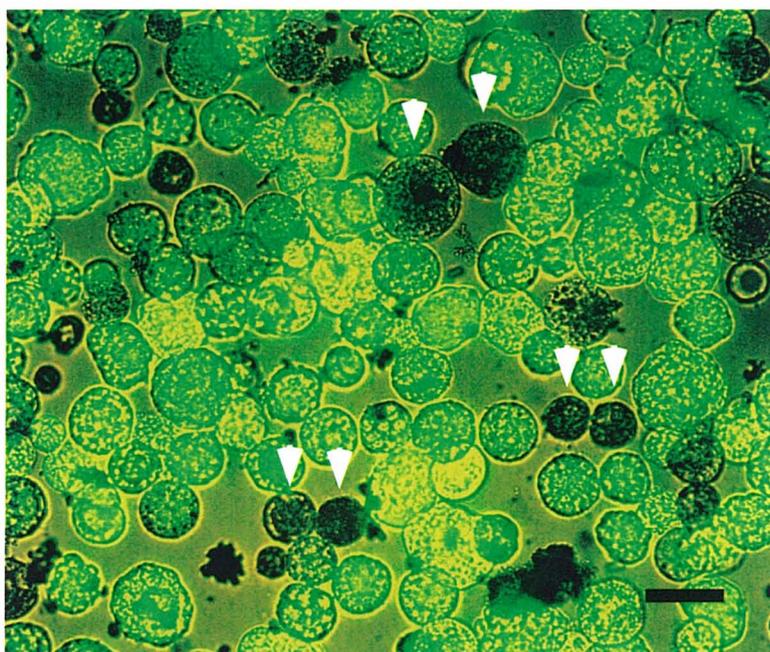


Fig. 3-1. Photograph of freshly isolated protoplasts derived from suspension cultures of Japanese bunching onion cv. 'Kairyuu-Hakushu 5 Gou' stained by fluorescent diacetate (FDA). Viable protoplasts generated fluorescence (Larkin, 1976), but some protoplasts did not (white arrow-heads). Horizontal bar in the figure indicates 50 μ m.

得られたプロトプラストは淡黄色の真球状をしており、その直径は 15–45 μm の範囲であった (Fig. 3-2. A). Nagata and Takebe (1976) の方法に従い、Calcofluor により得られたプロトプラストの細胞壁染色を実施した。その結果、染色されるプロトプラストは観察されなかった。

3-2-2. プロトプラストの洗浄および回収のための遠心分離条件

酵素処理を完了した後、プロトプラストと酵素液とを分離するとともに、プロトプラストの精製・洗浄のためには遠心分離操作を必要とする。そこで、遠心力がプロトプラストに与える影響について調査を行った。その結果を Table 3-2 に示した。プロトプラスト収量は 60×g の遠心条件で最高値 8.6×10^6 個・ 1gFW^{-1} となった。最低値は 480×g で 7.1×10^6 個・ 1gFW^{-1} の収量であった。プロトプラスト収量は 30–480×g の遠心処理区間で大差がなかった。一方、初期細胞分裂 (Fig. 3-2 B) 率は遠心力の差が認められ、30–120 ×g の範囲だと 13 % 以上と高い分裂率を示したが、240×g 以上にすると 6.9 % 以下に低下した。最高の初期細胞分裂率は 60×g の場合で 17.2 % であった。

なお、細胞は引き続き細胞分裂を繰り返し、2 週間後には数個の細胞集団へと発達した (Fig. 3-2. C)。

3-2-3. プロトプラスト培養のための好適培地条件の探索

(1) 無機塩類組成

BDS 無機塩のなかに調合されている 25 mM KNO_3 と 4 mM NH_4NO_3 を対照 (これを 5/5 と表記) として、これらの濃度を 0/5, 1/5, 2/5, 3/5, 4/5 とした組成でプロトプラスト培養を行った (Table 3-3.)。その結果、4/5 の処方では 8.4 % の最高の初期分裂率が得られた。BDS 原法 (5/5) は 3.0 % と 4/5 の半分以下の分裂率であった。また、3/5 以下に減じると分裂率は 4.7% 以下になり、 KNO_3 と NH_4NO_3 を含まない処方ではプロトプラストの分裂は認められなかった。

この結果から、 KNO_3 に着目して初期分裂を促進するための最適濃度を検索

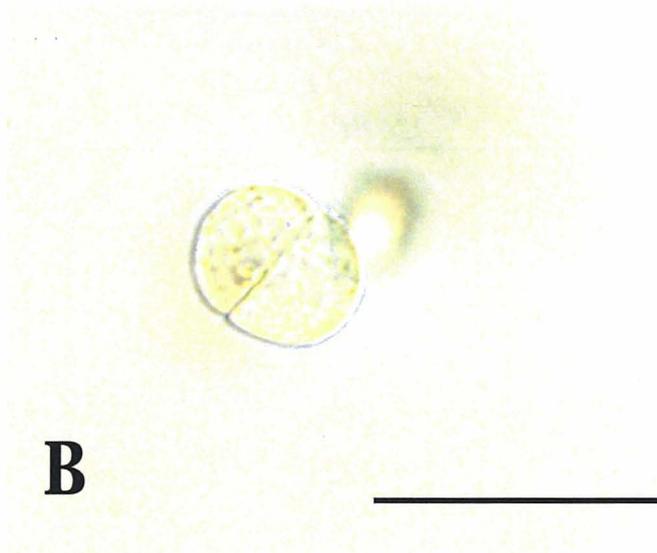
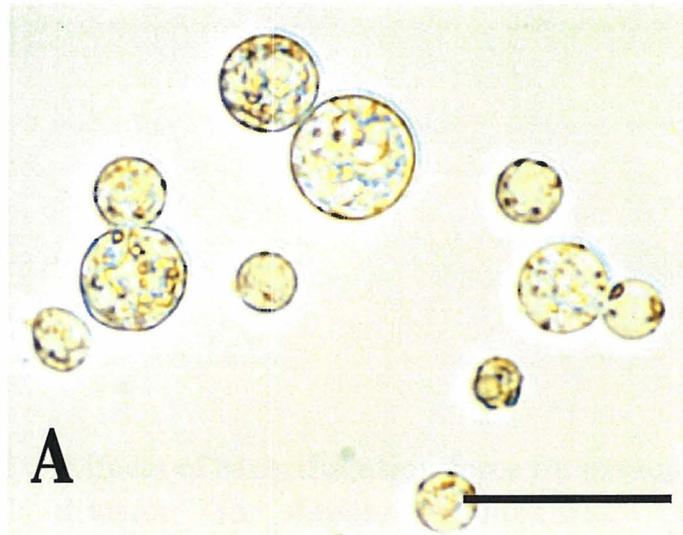


Fig. 3-2. Protoplast cultures in Japanese bunching onion cv. 'Kairyō-Halushu 5 Gou'. (A) Freshly isolated protoplasts from cell suspension culture, (B) First cell division after a week culture, (C) Actively dividing cell cluster after 2 weeks culture. Scale bars indicate $50\ \mu\text{m}$.

Table 3-2. Effects of centrifugation force on protoplast yield and cell division in Japanese bunching onion cv. 'Kairyō-Hakushu 5 Gou' ^z.

Centrifugation force ^y (×g)	Protoplast yield (×10 ⁶ · 1gFW ⁻¹)	Initial cell division ^x (%)
30	7.9 a	13.9 b
60	8.6 a	17.2 c
120	8.1 a	15.6 bc
240	7.4 a	6.9 a
480	7.1 a	6.4 a

^z Different letters in the same column represent significant differences by Duncan's multiple range test at 5 % level (n=3).

^y Each centrifugation treatment was repeated three times.

^x Initial cell division was investigated 10 days after culture.

Table 3-3. Effects of inorganic nitrogen source - strength on cell division in Japanese bunching onion.

Strength of inorganic nitrogen sources ^z	Cell division ^y (%)
0 / 5	0.0 a
1 / 5	3.6 b
2 / 5	4.0 b
3 / 5	4.7 b
4 / 5	8.4 c
5 / 5	3.0 b

^z Strength of nitrogen sources in BDS inorganic salts was presented as 5/5.

^y Cell division was investigated after a 8 days culture. Different letters in the column represent significant differences by Duncan's multiple range test at 5 % level (n=3).

した。その結果を Fig. 3-3. に示した。KNO₃を無添加とした場合、初期細胞分裂率は 7.3 %であったのに対し、5 または 10 mM 添加することによってその頻度は 9.6 % 以上に向上した。15 mM 以上の添加では、7.8 %以下となり、5 および 10 mM に比べて低かった。BDS 処方の 25 mM では、細胞の生存率が低く褐変する細胞が多かった。細胞分裂率は生存細胞中の分裂細胞の割合を算出していることから、結果として細胞分裂頻度は 7.6 % となったが、細胞の発達は明らかに阻害されることが観察された。

次に、プロトプラストの発達を促進する効果は、硝酸イオンまたはカリウムイオンかどうかを明らかにするため、硝酸イオン濃度を 5 mM に固定し、カリウムイオン濃度を変えてプロトプラスト培養を行った (Fig. 3-4.)。KCl 濃度が 5 mM の場合に最高の細胞分裂率 12.6 % となった。0, 5 および 10 mM の濃度で分裂率は 10 % 以上と高かった。KCl 濃度が 15mM 以上では 10% 未満となり前三者に比べて低かった。

培地中の硫酸イオンの有無がネギのプロトプラストの発達に及ぼす効果を検討した。その結果を Table 3-4. に示した。硫酸イオンを含む培地で培養するとコロニー形成数は 6 cm シャーレ当たり 49 個であった。一方、これを含まない培地では 177 個と対照の 3 倍以上となり、コロニー形成数は飛躍的に増加した (Fig. 3-5. A および B)。

(2) 植物生長調節剤

2,4-D の 6 水準、BAP の 4 水準を組合わせて、初期細胞分裂率を調査した。その結果を Fig. 3-6. に示した。細胞分裂率は、2 μM の 2,4-D と 0.2 または 1 μM の BAP の組合わせで、それぞれ 9.9, 9.3 % と高かった。2,4-D 濃度が 0.5 μM 以上で 0.2 および 1.0 μM の BAP の濃度を組合わせた場合、細胞分裂率は 5% 以上と比較的に高かった。2,4-D 濃度が 0.2 μM 以下では、BAP 濃度にかかわらずその率は 3 % 以下であった。

(3) 糖組成

培地の好適な浸透圧を検索するため、ショ糖濃度として 0.40, 0.45, 0.50, 0.55 および 0.60 M を培地に添加して培養を行った。合わせて、オスモメー

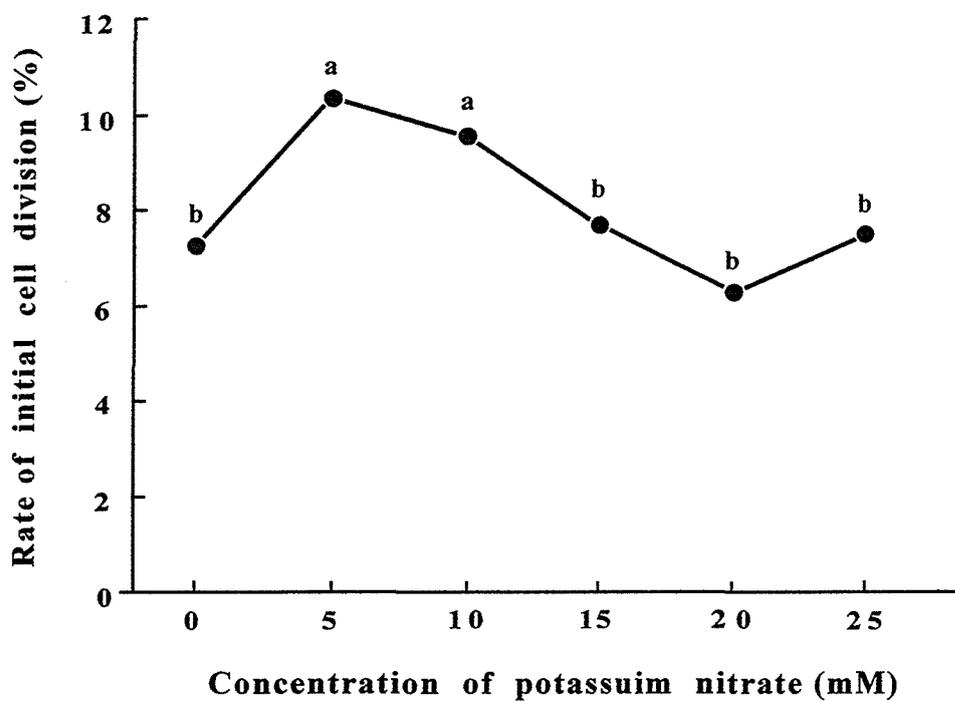


Fig. 3-3. Effects of potassium nitrate (KNO_3) on initial cell division in protoplast culture of Japanese bunching onion. The cell division rate was investigated 10 days after incubation; $n=3$. Different letters indicate significant differences at the 5 % level by Duncan's multiple range test.

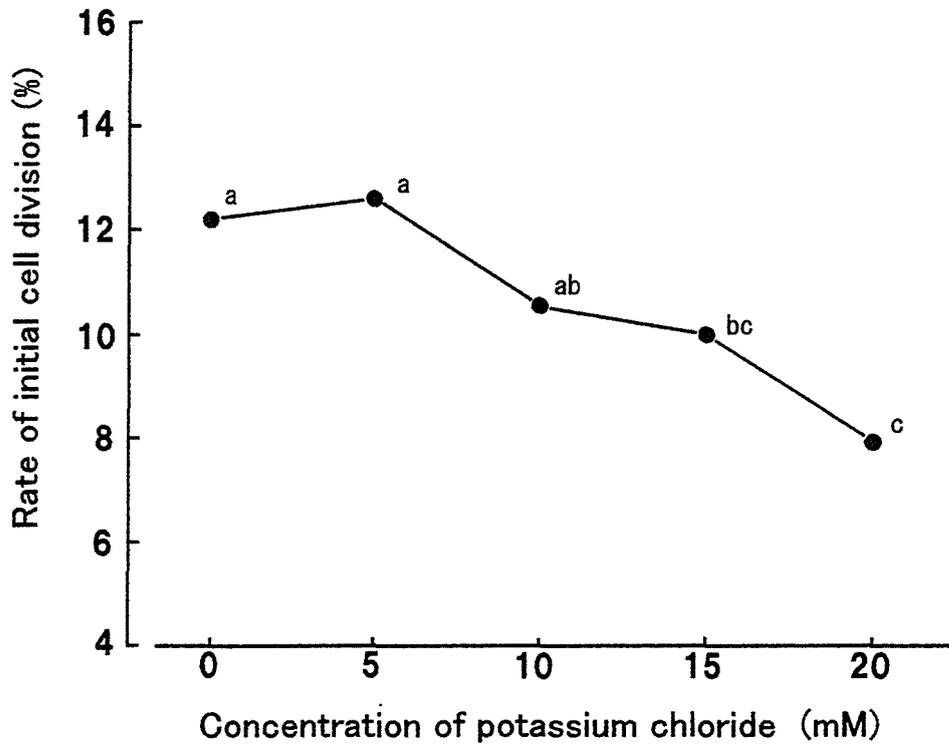


Fig. 3-4. Effects of potassium chloride(KCl) on initial cell division in protoplast culture of Japanese bunching onion. The initial cell division was investigated 10 days after incubation; n=3. Different letters in the figure indicate significant differences at the 5 % level by Duncan's multiple range test.

Table 3-4. Effects of sulfate (SO_4^{2-}) in protoplast culture medium on cell colony formation in Japanese bunching onion.

Sulfate ^z	No. of cell colonies formed ^y
Contained (control)	49.3
Not contained	177.3 ** x

^z Contained; 1.01 mM ammonium sulfate [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] and 1.0 mM magnesium sulfate (MgSO_4), not contained; 2.02 mM ammonium chloride (NH_4Cl) and 1.0 mM magnesium chloride (MgCl_2).

^y Cell colonies in 6 cm culture dish were investigated 45 days after culture.

^x **: Significant at $P < 0.01$ by t-test.

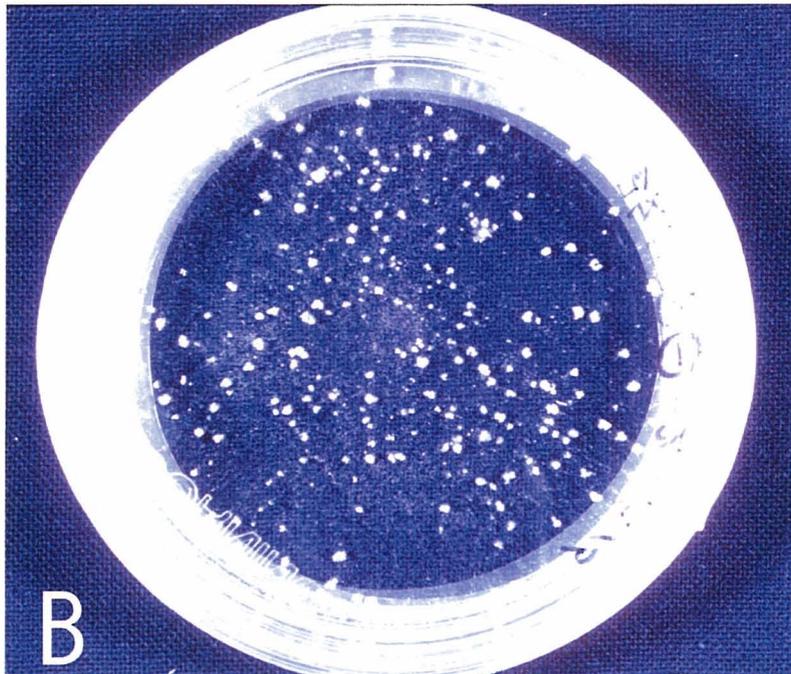
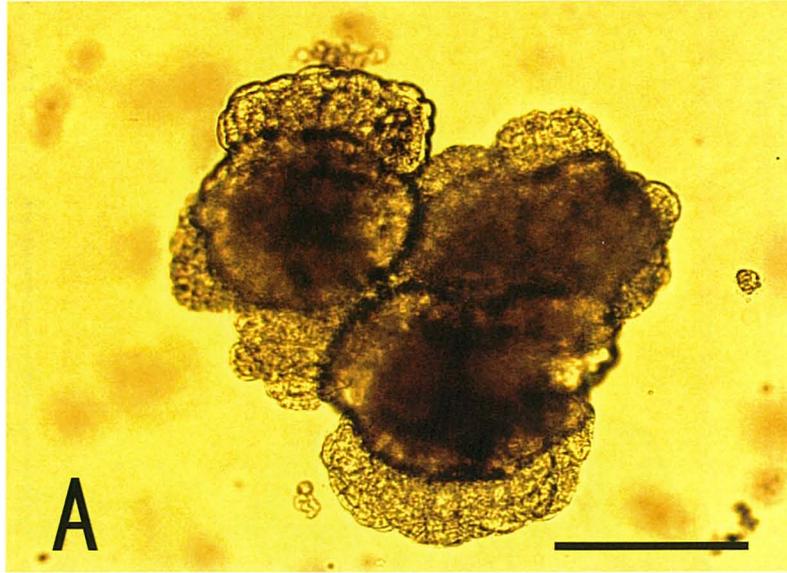


Fig. 3-5. Colony development from protoplasts of Japanese bunching onion cv. 'Kairyō-Hakushu 5 Gou'. (A) Colony development after 30 days culture, (B) Visible micro-calli after 45 days culture. Scale bar indicate 500 μ m in (A).

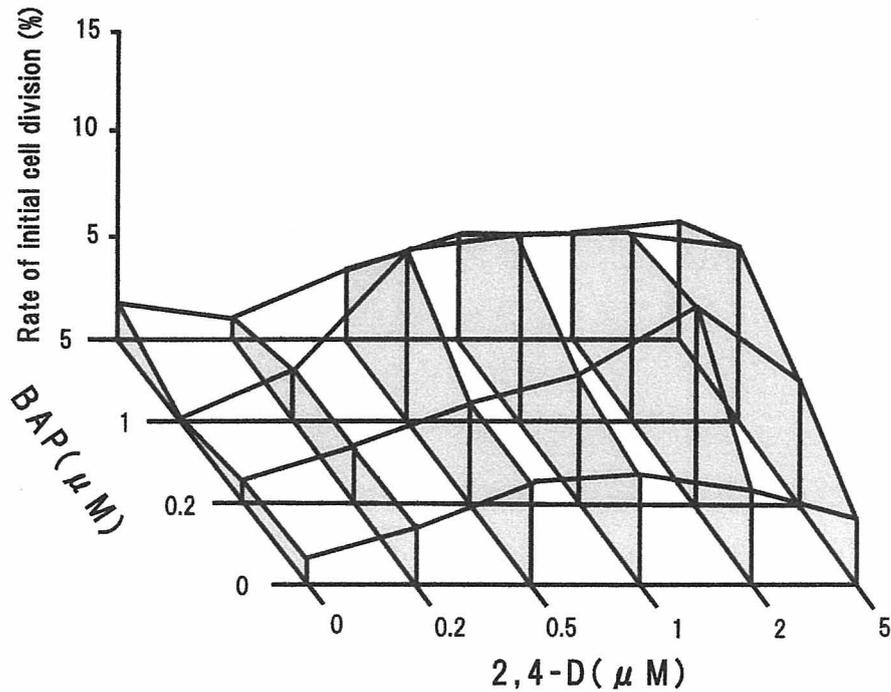


Fig. 3-6. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 6-benzylaminopurine (BAP) at different concentrations on initial cell division in protoplast culture of Japanese bunching onion. The rates of initial cell division were investigated 10 days after incubation. Each data point represents the mean value from two replicates of wells in microplates.

ターによりそれぞれの培地の浸透圧を測定した。その結果を Fig. 3-7. に示した。糖濃度として 0.40 および 0.45 M で初期細胞分裂率はそれぞれ 6.5, 6.8 % と高かった。0.50 M 以上では前 2 区の半分以下であった。0.40 および 0.45 M のシヨ糖を含む培地の浸透圧を測定すると、それぞれ 0.54, 0.63 osmol · kg⁻¹ であった。

シヨ糖とブドウ糖の濃度割合を変えてプロトプラストの培養試験を行った。その際、培地の浸透圧を 0.61 osmol · kg⁻¹ に固定した。その結果を Fig. 3-8. に示した。シヨ糖とブドウ糖をそれぞれ 0.2 M 添加した培地で初期分裂率は最高値 19.1 % を示した。続いてブドウ糖単独添加培地が高く 15.0 % であった。シヨ糖単独添加培地は 7.8 % と最低の分裂率であった。

次に、シヨ糖とブドウ糖濃度をそれぞれ 0.2 M ずつ添加した上、果糖を無添加、0.05 および 0.1 M 添加した 3 種の培地で培養試験を行った。その結果を Fig. 3-9. に示した。果糖を 0.05 M 添加した培地で 18.5 % と最高の初期分裂率となった。果糖無添加と 0.1 M 添加培地は 15 % 前後の分裂率で 0.05 M 添加培地に比べて 3 % 程度ほど低かった。

(4) ビタミン組成

3 種のビタミン組成でプロトプラスト培養試験を実施した。その結果を Table 3-5. に示した。比較した 3 種のビタミン処方の中では TM-2 が最高の初期分裂率を示し 10.3 % となった。B5 および 8P 処方では初期分裂率はそれぞれ 6.0, 4.3 % となり、TM-2 処方に比べて劣った。

(5) その他の有機化合物

ビタミン処方の中に含まれる 3 種の有機化合物について、さらに詳細に好適な濃度を検索した。その際の指標としてシャーレ当たりのコロニー形成数を採用し、試験区相互の比較をした。

イノシトールの試験では、0 から 35.52 mM までの濃度幅で検討した。その結果を Table 3-6. に示した。イノシトールを含まない培地では、コロニー形成数は 7 個であったのに対し、0.56 mM の添加でその数は飛躍的に向上し、6 倍の 42 個となった。35.52 mM の多量のイノシトールを含む培地のコロニ

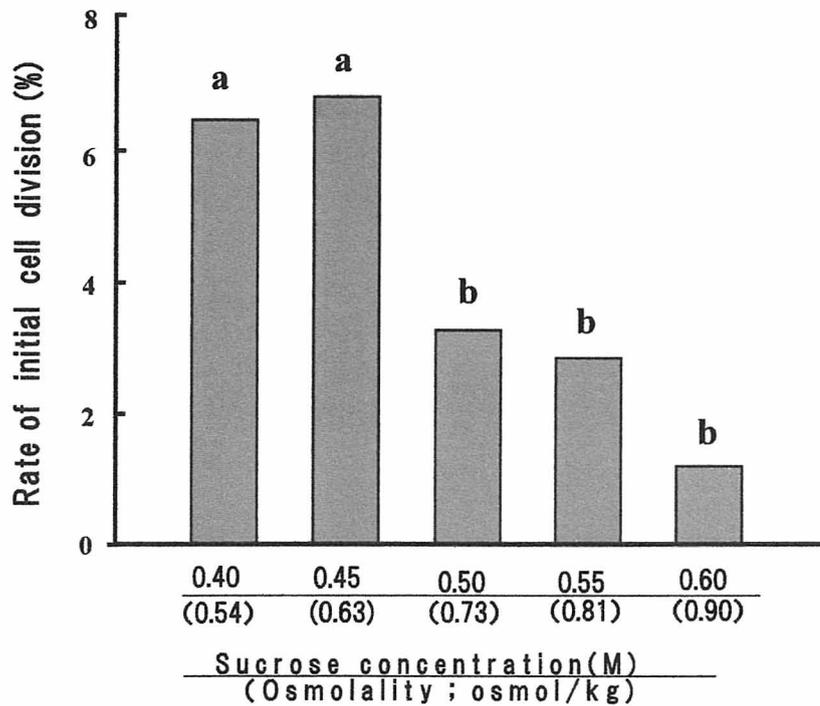


Fig. 3-7. Effects of osmolality on initial cell division in protoplast culture of Japanese bunching onion. The rate of initial cell division was investigated 10 days after incubation; n=3. Different letters indicate significant differences at 5% level by Duncan's multiple range test.

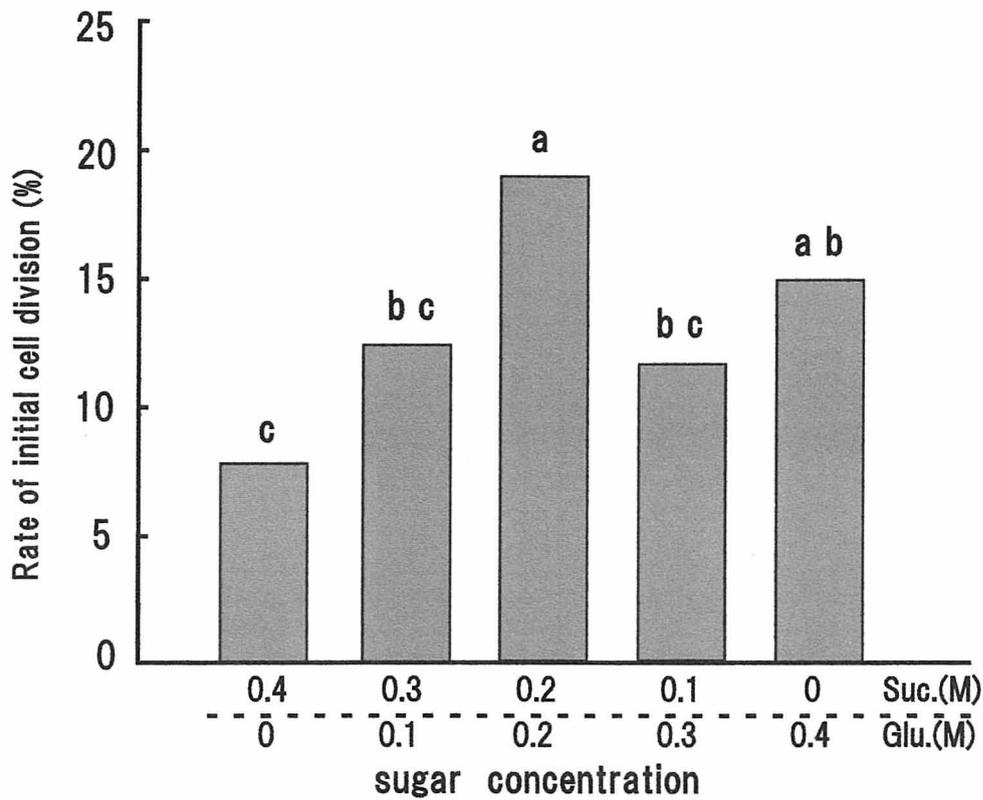


Fig. 3-8. Effect of sucrose (Suc.), glucose (Glu.) and mixtures of the two on initial cell division in protoplast culture of Japanese bunching onion. The rates of initial cell division were investigated 10 days after incubation. The osmolality of each medium was adjusted to $0.61 \text{ osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ with mannitol. Mean values from three independent experiments of petri dishes are shown. Different letters indicate significant differences at the 5 % level by Duncan's multiple range test.

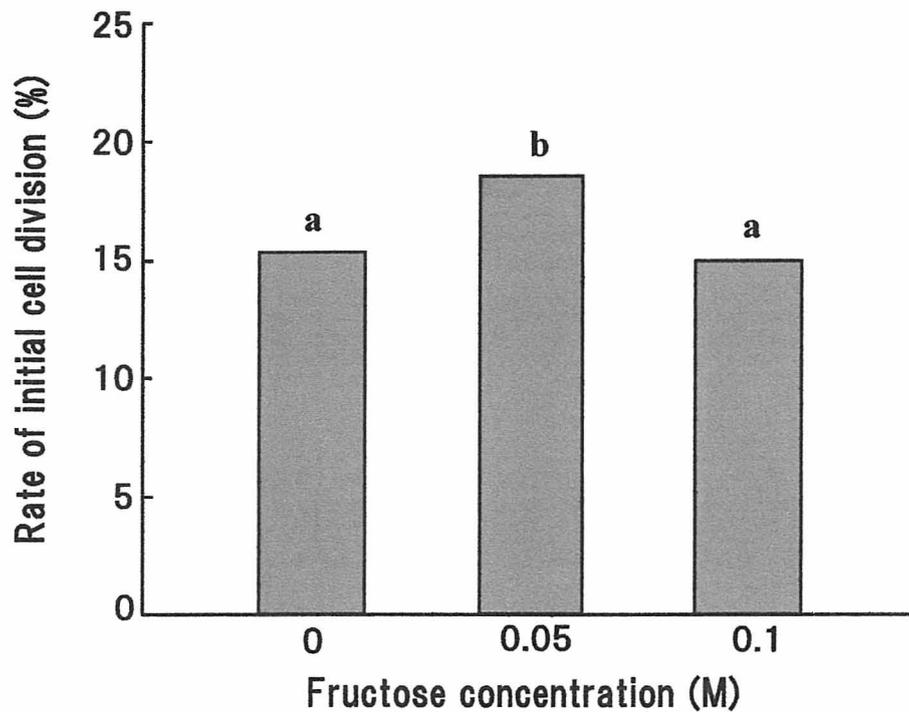


Fig. 3-9. Effects of fructose on initial cell division in protoplast culture of Japanese bunching onion. The rate of initial cell division was investigated 10 days after incubation; $n=4$. The osmolality of each medium was adjusted to $0.61 \text{ osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ with mannitol. Different letters indicate significant differences at 5 % level by Duncan's multiple range test.

Table 3-5. Effect of three vitamin-types on initial cell division in protoplast culture of Japanese bunching onion.

Vitamin type ^z	Cell division rate ^y ± Standard deviation (%)
B5	6.0 ± 3.2 b ^x
TM-2	10.3 ± 1.7 a
8 P	4.3 ± 1.8 b

^z B5;Gamborg et al.(1968),TM-2;Shahin (1985),8P; Kao et al. (1975).

^y The cell division was evaluated by counting the number of dividing cells among the 200 – 300 viable cells 10 days after incubation; n=5.

^x Different letters indicate significant differences at the 5 % level by Duncan's multiple range test.

Table 3 - 6. Effects of inositol in protoplast culture medium on cell colony formation in Japanese bunching onion.

Inositol concentration (mM)	No. of cell colonies formed ^z
0	7.0 a
0.56	42.0 d
2.22	15.3 b
8.88	19.3 b
25.53	13.7 b
35.52	33.7 c

^z Cell colonies in 6 cm culture dish were investigated 43 days after culture. Different letters in the column represent significant differences by Duncan's multiple range test at 5 % level (n=3).

ー形成数も、33.7個と0.56 mMの濃度区に次いで比較的にコロニー形成数が多かった。2.22, 8.88 および 25.52 mM のコロニー形成数は、それぞれ15.3, 19.3 および 13.7 個で 0.56 mM の添加区の半分以下と少なかった。

アスコルビン酸の試験はTM-2に含まれる0.0028 mMに加えて、0, 1, 2, および 4 mMの4水準の濃度を添加して行った。その結果をTable 3-7. に示した。試験区の表示は添加した濃度とした。アスコルビン酸無添加の場合は、8.0個のコロニー形成数であったのに対し、アスコルビン酸1 mMを添加することによってコロニー形成数は飛躍的に増加し、22.7 個となった。2 mM 添加では無添加と同等の7.0 個となった。アスコルビン酸4 mMを添加するとコロニーの形成は認められなかった。

細胞の酸化を防止することを目的をして、還元作用のあるシステインの添加を検討した。前試験と同様にTM-2に含まれる0.0057 mMのシステイン濃度に加えて、0, 1, 2, 4, および 8 mMの濃度を添加して試験を行った。その結果をTable 3-8. に示した。前試験と同様に試験区の表示は添加した濃度とした。システイン無添加の場合はコロニー形成は認められなかった。1 mM以上の添加でコロニー形成が観察され、1, 2, および 4 mMで7個前後のコロニー形成数であった。8 mM濃度でコロニー形成数は最高となり、11.7 個となった。

3-2-4. その他の培養条件

(1) 照度条件

白色蛍光灯による16時間照明下での照度がプロトプラストからのコロニー形成数に与える影響について試験を行った。その結果をTable 3-9. に示した。暗黒下の培養では12.3 個のコロニーが形成されたのに対し、840, 1,540, 2,870 lux と照度が高くなるとコロニー形成数はそれぞれ6.3, 4.7, および0.3 個と顕著に低下した。

(2) ナース細胞の添加効果

初期のプロトプラストの発達を促進することを目的として、ナース細胞の添加を検討した。試験は3 cmシャーレにナース細胞無添加の他、2, 5, 10 および

Table 3-7. Effects of ascorbic acid in protoplast culture medium on cell colony formation in Japanese bunching onion.

Ascorbic acid concentration ^z (mM)	No. of cell colonies formed ^y
0	8.0 b
1	22.7 a
2	7.0 b
4	0.0 c

^z 0.0028 mM ascorbic acid in TM-2 vitamins was not accounted.

^y Cell colonies in 6 cm culture dish were investigated 40 days after culture. Different letters in the column represent significant differences by Duncan's multiple range test at 5 % level (n=4).

Table 3-8. Effects of cysteine in protoplast culture medium on cell colony formation in Japanese bunching onion.

Cysteine concentration ^z (mM)	No. of cell colonies formed ^y	
0	0.0	a
1	7.7	b
2	7.3	b
4	6.7	b
8	11.7	c

^z 0.0057 mM cysteine which supplemented in TM-2 vitamins was not accounted.

^y Cell colonies in 6 cm culture dish were investigated 34 days after culture. Different letters in the column represent significant differences by Duncan's multiple range test at 5 % level (n=3).

Table 3—9. Effects of illuminance on cell colony formation in Japanese bunching onion.

Illuminance ^z (lux)	No. of cell colonies formed ^y
0	12.3 b
840	6.3 a
1,540	4.7 b
2,870	0.3 c

^z Cool white fluorescent lamps (National FLA0SS·EX-N/37) were used.

^y Cell colonies in 6 cm culture dish were investigated 34 days after culture. Different letters in the column represent significant differences by Duncan's multiple range test at 5 % level (n=4).

20 個の添加数で試験を行った。その結果を Table 3-10. に示した。ナース細胞を添加しない場合には 11.0 % の初期細胞分裂率となったが、2, 5, 10, および 20 個のナース細胞を添加すると、初期細胞分裂率はそれぞれ 7.3, 4.3, 3.3 および 2.1 % と低下した。顕微鏡により細胞の観察を行った結果、添加するナース細胞数が多いほど、原形質分離をおこしその発達を停止する細胞の割合が高かった。

上記の試験結果から、ナース細胞の無添加と添加した場合の培地の浸透圧の推移を調査した。その結果を Fig. 3-10. に示した。ナース細胞無添加のばあいにおいては、培地の浸透圧は直線的に上昇した。一方、ナース細胞を添加した場合も培地の浸透圧は直線的に上昇したが、4日以降は無添加に比べて 10 % 以上高く推移した。培養 10 日目の培地の浸透圧は、ナース細胞無添加と添加の場合でそれぞれ $0.78, 0.90 \text{ osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ となった。

培養 10 日目のグルコース濃度を測定した結果、ナース細胞無添加と添加でそれぞれ 0.33, 0.38 M と、培養当初に添加した 0.20 M の 1.5 倍以上に上昇した。ナース細胞添加の方がその上昇幅が多かった。

3-2-5. ネギプロトプラスト由来カルスからの植物体再生

プロトプラスト由来カルスからの植物体再生を検討した。第 II 章で決定した幼植物由来カルスからの植物体再生培地を基本とし、培地中のショ糖濃度について、0.10, 0.15, 0.20, 0.25 および 0.30 M の 5 水準でシュート形成率を比較した。その結果を Table 3-11 に示した。0.15 M のショ糖濃度区で置床した 15 個のカルス中の 7 個 (46.7 %) でシュートが発達し、最高のシュート形成率となった (Fig. 3-11. A)。続いて 0.20 M 区で 15 個のカルス中 6 個 (40.0 %), 0.15 M 区で 15 個中 5 個 (33.3 %) からシュートが再生した (Fig. 3-11. A)。0.25 M 以上のショ糖濃度区では 30 % 以下の再生率となり、前三者に比較してその率は低かった。

得られたシュートはカルスから切り離して植物生長調節剤を含まない培地に移植すると、約 1 ヶ月後にはシュート基部から多くの発根が観察された (Fig. 3-11. B)。一部の植物体で生育の遅延、葉身のねじれ、発根不良などの奇形が認

Table 3-10. Effects of nurse cell clumps on cell division in Japanese bunching onion.

No. of nurse cell clumps added ^z	Cell division ^y (%)
0	11.0 a
2	7.3 ab
5	4.3 bc
10	3.3 c
20	2.1 c

^z Cell clumps with 1.5 – 2.0 mm in diameter were added in the protoplast culture dish.

^y Cell division was investigated 10 days after culture. Different letters in the column represent significant differences by Duncan's multiple range test at 5 % level (n=3).

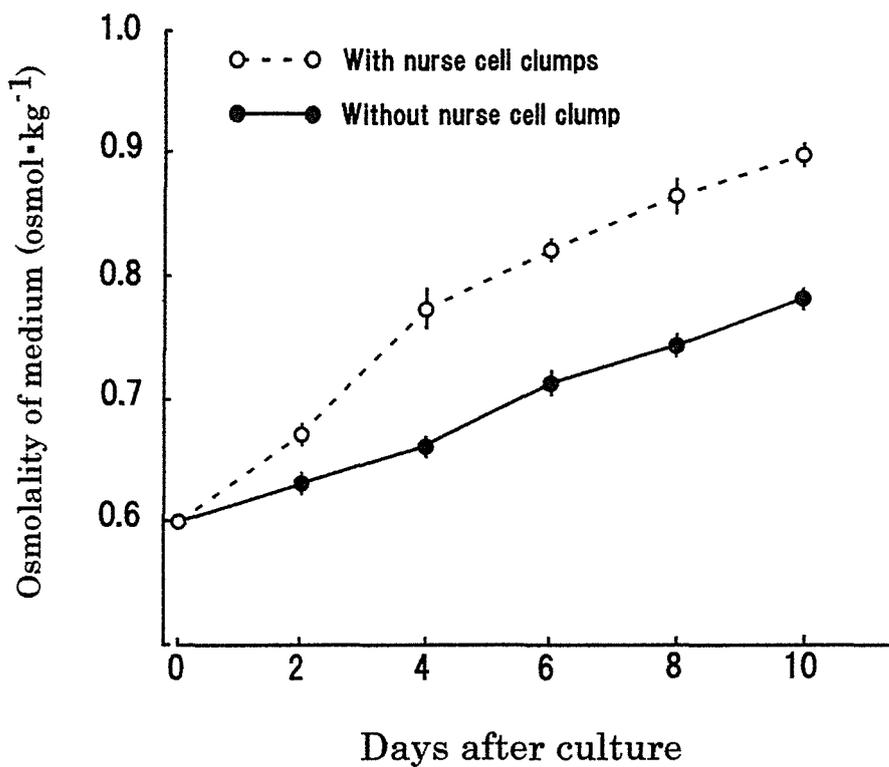


Fig. 3-10. Osmolality change in protoplast culture medium incorporated with or without nurse cell clumps. Initial osmolality of medium was set up at $0.60 \text{ osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$. Each point represents the mean value from three replications. Vertical bar indicates standard deviation.

Table 3-11. Effects of sucrose concentration on plant regeneration from protoplast-derived callus in Japanese bunching onion.

Sucrose concentration (M)	No. of calli inoculated ^z (A)	No. of calli with shoots ^y (B)	Regeneration frequency (B/A, %)
0.10	15	5	33.3
0.15	15	7	46.7
0.20	15	6	40.0
0.25	15	4	26.7
0.30	15	2	13.3

^z Calli, more than 2 mm in diameter, were transferred on plant regeneration medium.

^y Calli with shoots were counted after a two-month culture.



Fig. 3-11. Plant regeneration from protoplast-derived calli of Japanese bunching onion. (A) Development of shoots from protoplast-derived calli, (B) Whole plant recovery, (C) Acclimatized plant in a greenhouse.

められた。培養器内で形態的に健全な個体をガラス温室内のパーミキュライトを充填したポットに移植し、高湿度を保って順化した。その結果、順調に生育することが確認された(Fig. 3-11. C)。

第4節 考 察

Cocking (1960)は木材不朽菌を培養してセルラーゼを抽出し、これをトマトの根端に処理をしてプロトプラストを単離した。その後、多くの植物種の組織からプロトプラストが単離されたが、飛躍的な進歩が遂げられたのは、建部ら(1968)が市販の酵素を用いて大量のプロトプラストを単離したことによる。

プロトプラストは厳密な意味での単細胞であり、これを実験材料に用いることによって正確な細胞レベルの解析が可能で、細胞レベルでのスクリーニングを適用することができる。また、細胞壁が取り除かれているために、プロトプラストは植物種に関わりなく相互に細胞融合することや、遺伝情報を有する高分子を細胞内に取り込むことが知られてから、これを利用した新しい植物育種法の可能性も示唆された(長田, 1979)。

ネギ属植物には多くの重要な作物が含まれていることから、タマネギ、ネギ、ニンニクなどの各ネギ属植物においては、いち早くプロトプラストの単離と培養に関する研究が進められた。しかし、プロトプラストからの植物体再生系が報告されたのは1990年代に入ってからであった。これらの成功例のポイントは盛んに細胞分裂している組織や細胞塊から生理活性の高いプロトプラストを単離することと考えられる。すなわち、リーキ(Buiteveld and Creemers-Molenaar, 1994)とタマネギ(Hansen et al., 1995)では懸濁培養細胞が、ニンニク(Ayabe et al., 1995)では苗条原基がそれぞれのプロトプラストを単離するための材料として用いられた。実際に、禾本科植物では葉肉および葉身組織から単離されたプロトプラストからの植物体再生系の報告は皆無であり、懸濁培養細胞から単離したプロトプラストを用いてのみ植物体の再生系が開発されている(Vasil and Vasil, 1992)。

そこで本章では、前章で確立したネギの懸濁培養細胞を材料としてプロトプラストを単離し、再現性のあるプロトプラスト培養と植物体再生系の開発を目

指した。ネギのプロトプラスト培養を始めるに際して、Wang et al.(1986)の報告に従ってMS培地(Murashige and Skoog, 1962)を適用したが、継続的な細胞分裂は観察されなかった。従って、ネギプロトプラストに好適な培地成分の検索や培養手法の諸条件について詳細に検討することとした。

ネギ懸濁培養細胞から酵素的にプロトプラストを単離するためには浸透圧条件が重要と考えられたので、酵素液中のマニトール濃度について検討した。プロトプラスト収量およびその生理活性を考慮すると0.6 Mのマニトール濃度が適当と判断された。すなわち、検討したマニトール濃度の範囲では 5×10^6 個・ 1gFW^{-1} 以上と培養するに十分なプロトプラスト収量が得られたので、FDA染色による活性を重要視した(Fig. 3-1.)。得られたプロトプラストは真球状をしており、細胞壁の染色像は観察されなかったことから良質のプロトプラストと考えられた(Fig. 3-2. A)。細胞壁を持たないプロトプラストが物理的な衝撃に弱く、操作上細心の注意が求められる。プロトプラストの精製のためには遠心操作が不可欠であることから、好適な遠心条件について検索した。120×g以下で細胞分裂率は13%以上が確保された。その中でも60×gで収量および細胞分裂率ともに高かったので、60×gの条件でプロトプラストを精製することが適当と判断された。

プロトプラスト培養に際しては、培地条件が重要と考えられたので培地成分について詳細な検討を行った。Dunstan and Shoot (1977)はタマネギのカルスを供試して、B5無機成分(Gamborg et al., 1968)を基本として窒素およびりん酸成分の適正化を図りBDS培地を開発した。この知見に従って、さらにネギプロトプラストに好適な無機塩組成を検索した。プロトプラスト培養にとってはBDS原法の窒素成分を4/5に減じると細胞分裂率の向上が認められた。そこでBDS無機塩組成の中で比較的大量に含有される KNO_3 量について最適化を検討した結果、5 mMが適当と考えられた(Fig. 3-3.)。硝酸イオンを一定にしてカリウムイオン濃度の水準を変えて細胞分裂率を調査した結果では、0から10 mMの範囲で細胞分裂率が高く5 mMが最適ではないことから(Fig. 3-4.)、プロトプラストの発達に対する KNO_3 の効果は硝酸イオン濃度に起因すると考えられた。Feller (1993)はニンニクのプロトプラスト培養に取り組んだ経験からアリイン、アリシンなどの含硫化合物の生成によって、細胞分裂が阻

害されると推察した。本試験で、硫酸イオンを塩素イオンに置換した化合物を培地に添加してプロトプラスト培養を検討した結果、硫酸イオンを含む培地と比べて3倍以上のコロニー形成が観察された(Table 3-4.)。本試験ではアリンおよびアリシンの定量を実施しなかったため、これらがプロトプラストの発達を阻害する要因であることは立証できなかったが、Feller の仮説を間接的に支持する結果となった。

従来、プロトプラスト培養に関する試験では植物生長調節剤や有機化合物などの適正化に関わる試験が多くを占めるが、培養が困難なプロトプラストに対しては無機塩類に着目することも必要であろう。少なくともネギプロトプラスト培養においては、これらの無機塩類の適正化を図った結果、プロトプラストから安定してコロニーへの発達が安定して誘導された (Fig. 3-5.A および B)。

植物生長調節剤の試験では、 $2 \mu\text{M}$ の 2,4-D と 0.2 または $1.0 \mu\text{M}$ の BAP を組合わせた場合に細胞分裂率が高かった。Karim and Adachi (1997) はタマネギのプロトプラストを対象として植物生長調節剤の試験を行い、 $4.5 \mu\text{M}$ 2,4-D, $4.4 \mu\text{M}$ BAP および $5.4 \mu\text{M}$ NAA の添加が最適であることを報告している。彼らの植物生長調節剤の添加濃度に比べ、本試験結果は比較的到低濃度である。彼らは植物体再生に成功していないことから、高濃度の植物生長調節剤の使用が植物体再生に対して阻害要因となったと推察される。

プロトプラスト培養に際しては、培地の浸透圧の適正化が重要であることが指摘されている (Smith et al. 1984)。しかし、ネギ属植物のプロトプラスト培養において、培地の浸透圧はもとより培養に好適な糖組成に関する知見は得られていない。従って、本試験では、培地の浸透圧の適正化を図るとともに、好適な糖組成を検索することとした。培地中のショ糖濃度を変えて試験を行った結果、ショ糖濃度として 0.40 または 0.45 M で初期細胞分裂率が高かった (Fig. 3-7.)。この濃度での浸透圧はそれぞれ $0.54, 0.63 \text{ osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ であった。この結果からネギプロトプラスト培養では $0.6 \text{ osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 前後の浸透圧が適当と考えられた。ネギの生体中にはショ糖、ブドウ糖、果糖を主とした糖類が含有されている (水野・金兵, 1955) ことから、ショ糖とブドウ糖の濃度比について検討した。その結果、それぞれが等量の 0.2 M を含む培地で 19% の細胞分裂率となり、ショ糖単独添加の2倍以上の効果が認められた (Fig. 3-8.)。

ショ糖とブドウ糖は 0.2 M として、果糖濃度についても検討を加えた。その結果、0.05 M の添加で高い分裂率が得られた(Fig. 3-9.)。以上の結果から、ネギプロトプラスト培養のための糖組成は、ショ糖、ブドウ糖および果糖をそれぞれ 0.2, 0.2 および 0.05 M とすることが適当と判断された。

次に、ビタミン組成について検討した。トマトのプロトプラスト培養で開発された TM-2 が他の 2 種のビタミン組成よりも分裂率が高く、ネギプロトプラストに適していた (Table 3-5.)。ネギ属植物のプロトプラスト培養では 8P 処方のビタミン類が利用されているが (Buiteveld and Creemers-Molenaar, 1994; Hansen et al., 1995; Ayabe et al., 1995), 本試験では最低の分裂率であった。TM-2 処方には 16 種の有機化合物が含まれており、どの成分がネギプロトプラストの発達に有効であるかは明らかにすることはできなかった。Z 前試験で TM-2 が有効であることが明らかとなったが、TM-2 処方中には $4600 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ と多量のイノシトールが処方されている。このイノシトール含有量がネギプロトプラストに対して必要であるかどうかを検証するため、イノシトール濃度の試験を実施した。その結果、 $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ の添加でプロトプラストからのコロニー形成数が最大となり、TM-2 処方のイノシトールは適さないことが示された (Table 3-6.)。

ネギプロとプラストの培養中に細胞が褐変してその発達が停止することがしばしば観察されたので、還元作用を有するアスコルビン酸とシステインの添加を検討した。アスコルビン酸は 1 mM の添加で効果が認められた。一方、システインは 1 mM 以上で効果があり、8 mM で最高の分裂率となった (Table 3-7. および Table 3-8.)。しかし、システインはアリシンの前駆物質であることが知られており (Lancaster et al., 1988), 多量の添加は避けるべきと判断されたので、実用上では 1mM の添加が適当と考えられた。

以上のように、ネギプロトプラスト培養のための培地について詳細に検討を加え、培地中の無機および有機成分の内の 13 種の化合物の適正化を図った。改変した培地組成を Table 3-12. に取りまとめた。

培地以外の種々の培養手法について検討した結果、ネギのプロトプラストの発達に対しては照明は不必要で、暗黒下の培養でコロニー形成数が多かった (Table 3-9.)。さらに、ネギプロトプラストの発達を促進するため、ナース細

胞の添加効果を調査した。その結果、ナース細胞の添加数が多いほどコロニー形成数は顕著に減少し、明らかな阻害作用が認められた (Table 3-10.)。その原因としては顕微鏡観察からナース細胞数が多いと原形質分離を起した細胞の割合が高いことから、浸透圧の上昇に起因すると推察された。そこで経時的に浸透圧の変化を追跡した。その結果、ナース細胞の添加により浸透圧が顕著に上昇することが明らかとなった。また、ナース細胞を添加しない場合でも浸透圧は上昇し、10日目には培養開始時よりも $0.2 \text{ osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 程度の上昇を示した (Fig. 3-10.)。一般に、プロトプラストの培養に際しては、培養後1週間目あたりに新しい培地を添加することが経験的に行われている。本試験を通じて、浸透圧の上昇を緩和することがその根拠であることが明らかとなった。浸透圧の上昇は、培養開始時よりもブドウ糖濃度が高くなっていることから、ショ糖が細胞の中外で加水分解されてブドウ糖と果糖が生ずる結果であろうと推察される。先の糖組成の試験で、ブドウ糖単独添加の培地で細胞分裂率が比較的高かった結果もこのことを支持している。

プロトプラストから発達したコロニーをカルス形成培地に移植して2週間培養したカルスを供試して、植物体再生を検討した。前章で確立した培地の中のショ糖濃度について試験を行った結果、ショ糖濃度としては 0.15 M が適当で (Table 3-11.)、本濃度下では約半数のカルスからシュートの形成が観察された (Fig. 3-11. A)。カルスからシュート基部から切除して、植物生長調節剤を含まない培地に移植すると、シュート基部から発根が認められた (Fig. 3-11. B)。発根を終えた植物はガラス温室内で高湿度を保持しながら順化を行った。順化したほとんどの個体は温室内で生育することが可能であった (Fig. 3-11. C)。

以上のように、本章ではネギプロトプラストからの植物再生を目指して、その培養に好適な培地成分、培養手法、および植物体の再生法について明らかにすることができた。本試験で構築した培養法は極めて安定した培養系で、カルス誘導から出発し懸濁細胞培養を行い、プロトプラスト培養および植物体再生について数回繰り返した結果、再現性が確認されている。従って、本培養系は細胞融合およびエレクトロポレーションによる外来遺伝子の導入などの新育種法のための有効な手段を提供するものと考えられる。

Table 3-12. Proposed medium composition for protoplast culture of Japanese bunching onion.

Constituents	Concentrations	
<i>Inorganic Salts</i> ^z		
KNO ₃	506 mg/l	(5.0 mM)
NH ₄ NO ₃	320	(4.0 ")
NH ₄ H ₂ PO ₄	230	(2.0 ")
NH ₄ Cl	108	(2.0 ")
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	172	(1.1 ")
CaCl ₂ · 2H ₂ O	450	(3.0 ")
MgCl ₂ · 6H ₂ O	203	(1.0 ")
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.9	(0.10 ")
Na ₂ EDTA	37.3	(0.10 ")
MnSO ₄ · 4H ₂ O	13.2	(0.045 ")
H ₃ BO ₄	3.0	(0.049 ")
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.0	(7.0 μ M)
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.039	(0.1 ")
KI	0.75	(4.5 ")
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	(0.11 ")
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	(1.0 ")
<i>Sugars and Sugar Alcohols</i>		
Sucrose	34.25 g/l	(0.10 M)
Glucose	18.00	(0.10 M)
Fructose	4.50	(0.025 M)
Mannitol	40.80	(0.22 M)
<i>Vitamins</i> ^y		
Nicotinic acid	2.50 mg/l	
Thiamine hydrochloride	10.0	
Pyridoxine hydrochloride	1.0	
Folic acid	0.50	
Biotin	0.05	
Calcium pantothenate	0.05	
Choline chloride	0.10	
Glycine	0.50	
Casamino acids ^x	150.0	
Cysteine	175.6	
Malic acid	10.0	
Ascorbic acids	176.1	
Adenine sulfate	40.0	
Glutamine	100.0	
Inositol	100.0	
Riboflavin	0.25	
<i>Growth Regulators</i>		
2,4-D	0.44 mg/l	(2.0 μ M)
BAP	0.23 "	(1.0 ")
<i>Others</i>		
MES (pH buffer) ^w	4.27 g/l	(20 mM)
pH	5.8	

Note) ^z: modified BDS medium(Dunstan and Short,1977)

^y: modified TM-2 formula (Shahin, 1985)

^x: acid-hydrolyzed casein (DIFCO)

^w: 2-morpholinoethanesulfonic acid

第4節 摘要

前章で確立したネギ懸濁培養細胞を供試し、プロトプラストを単離・精製するための諸条件を検索した。さらに、ネギのプロトプラスト培養系の確立を目指して、プロトプラスト培養に好適な培地成分、培養条件および植物体の再生について検討した。得られた結果は以下のとおりである。

(1) 酵素液中のマニトール濃度は 0.60 M が適当で、本条件下で 9.6×10^6 個 $\cdot 1\text{g FW}^{-1}$ のプロトプラスト収量が得られ、フルオレセイン二酢酸染色 (FDA) による活性は 95% と検討したマニトール濃度の中で最高値を示した。プロトプラストの単離・精製のための遠心分離条件は $60 \times \text{g}$ が適当であった。

(2) BDS 無機塩類 (Dunstan and Short, 1977) を基礎としてプロトプラストの培養に好適な栄養条件を検索した。硝酸カリウムの濃度は 5 mM が適当であった。植物生長調整物質として、 $2\text{ }\mu\text{M}$ の 2,4-D と 0.2 または $1\text{ }\mu\text{M}$ のベンジルアデニンの組み合わせが細胞分裂を促進した。培地の浸透圧は $0.60\text{ osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 前後が適した。 0.2 M のショ糖と 0.2 グルコースを組み合わせると、細胞分裂が向上した。最終的な糖組成としては、ショ糖、ブドウ糖および果糖濃度としてそれぞれ $0.2, 0.2, 0.05\text{ M}$ の添加が適当と考えられた。ビタミン類は TM-2 処方 (Shahin, 1985) が適当であるが、イノシトール濃度は $100\text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ としアスコルビン酸およびシステインをそれぞれ 1 mM の添加することが適当であった。

(3) ネギプロトプラストの発達に対して、照明は阻害的に作用することが明らかとなった。糖濃度を漸減することによってプロトプラストはコロニーへと発達し、培養 45 日後には多くの小カルスが観察された。

(4) これらの小カルスをカルス形成培地に移植し、約 2 mm 大に発達したプロトプラスト由来カルスを用いて、改変 MS 培地上で植物体の再生を図った。植物体再生培地中のショ糖濃度としては、 0.15 M が適当であった。本条件下で約 50% のカルスからシュートの形成が認められた。これらのシュートを植物ホルモンを含まない培地に移植して発根を促した。ガラス温室内に移植した幼植物体は正常に生育した。

第IV章 ネギとタマネギとの電気細胞融合条件

本章では、ネギとタマネギとの体細胞雑種の開発を目指して、効率的で再現性のある電気細胞融合条件を明らかにする。

第1節 材料および方法

4-1-1. ネギおよびタマネギのプロトプラストの単離

ネギ(*Allium fistulosum* L.)の供試品種は‘改良伯州5号’とし、前章で確立した方法により、液体培養細胞からプロトプラストを単離した。一方、タマネギ(*A. cepa* L.)の供試品種は‘せきほく’とし、ショ糖2%を添加したMS培地(Murashige and Skoog, 1962)上に無菌播種し、約2週間後の幼植物の葉身からプロトプラストを単離した。タマネギプロトプラストを単離するための酵素組成および酵素処理時間はネギの場合と同様としたが、酵素液中のマニトール濃度は0.60Mに調整した。

4-1-2. 電氣的細胞融合のための細胞懸濁液

細胞融合に最適の細胞懸濁液を明らかにするため、浸透圧調節剤としてマニトール 0.67 M を添加し pH 5.8 とした基本調製液に、2(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)の無添加と 5 mM 添加の2水準に、塩化カルシウム 0, 0.5, 1.0, 2.5 および 5 mM の5水準を添加した合計10種の細胞懸濁液を調製して供試した。細胞融合装置は島津SSH-10、融合チャンバーは同社製のFTC-04を用いた。電気条件は、交流周波数1 MHz、交流印加電圧40 V、交流印加時間は1分間に設定し、パールチェーンの形成(Zimmermann and Scheurich, 1981)を促した。ネギまたはタマネギのプロトプラストは 1×10^5 個・ ml^{-1} の密度として単独で供試液に懸濁し、融合チャンバーに約2 mlを注入

した。交流印加後のパールチェーン形成状況について顕微鏡下で観察し、パールチェーン形成に対する各種懸濁液の効果を調査した。

4-1-3. 電氣的条件

(1) パルス電界強度

パールチェーン形成後のプロトプラスト融合を促進するため、最適のパルス電界強度について検討した。1.0, 1.25, 1.50, 1.75 および 2.0 $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ の 5 水準を設定した。さらに、細胞懸濁液は基本調製液に 5 mM MES または 0.5 mM 塩化カルシウム添加の 2 種を用いて、両者を比較検討した。その他の電氣的条件は、交流周波数 1 MHz, 交流印加電圧 80 V, 交流印加時間 20 秒, およびパルス幅 50 μ 秒として、パルスを 2 回印加した。ネギおよびタマネギプロトプラストは等量混合し、 2.5×10^4 個 $\cdot \text{ml}^{-1}$ の細胞密度にした。通電後ただちに全細胞数およびヘテロカリオン形成細胞数を顕微鏡下で計測し、ヘテロカリオン形成頻度（ヘテロカリオン形成数/全細胞数）を算出した。試験は 3 回反復した。

(2) 交流印加時間およびパルス幅

20, 40 および 60 秒の 3 水準の交流印加時間を設定して最適値を検討した。細胞懸濁液は前試験の結果から 0.5 mM の塩化カルシウム溶液を採用し、浸透圧調節剤として 0.67 M のマニトールを添加した。また、パルス電界強度 1.5 $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$, 交流周波数 1 MHz, 交流印加電圧 80V にそれぞれ設定した。融合チャンバーは FTC-64 を用いた。調査は前試験と同様とし、5 反復で試験を行った。さらに、50, 100 および 150 μ 秒の 3 水準のパルス幅について試験を行った。条件設定は交流印加時間の試験と同様であるが、試験は 3 反復した。

4-1-4. 細胞密度

ネギおよびタマネギプロトプラストを等量混合し、0.5, 1.0, 1.5 お

よび 2.0×10^5 個 $\cdot \text{m l}^{-1}$ の 4 水準の細胞密度を設定し最適な密度を検討した。細胞懸濁液は基本調製液に 0.5mM 塩化カルシウムを添加した溶液を用いた。また、通電条件は前試験で得られた最適値で実施した。融合処理後、未融合細胞数と融合細胞数を顕微鏡下で計測し、全細胞中のそれぞれの融合細胞の割合を算出した。試験は 4 回反復で行った。

第 2 節 結 果

4-2-1. ネギおよびタマネギプロトプラストのパールチェーン形成

ネギまたはタマネギプロトプラストを材料として、高周波電界によるパールチェーン形成のための細胞懸濁液組成を検討した。ネギではカルシウム濃度が低いほどパールチェーンの形成が認められ (Fig. 4-1.), カルシウム無添加の細胞懸濁液でその形成が最も促進された。1.0 mM 以上ではその形成は認められなかった。5 mM の MES を添加することによってその形成が促進される傾向が認められ、2.5 mM のカルシウム濃度においてもパールチェーンが形成された。MES 添加の有無に関わらず、5 mM 以上のカルシウム濃度ではパールチェーンは形成されなかった。タマネギプロトプラストも同様に、カルシウム濃度が低いほどパールチェーンの形成が促進された。ネギと同様に 2.5 mM 以上のカルシウム濃度が添加されると、パールチェーンは形成されなかった (Table 4-1.)。

4-2-2. パルス電界強度および細胞懸濁液組成

上記の結果から、0.5 mM のカルシウム溶液あるいは 5 mM の MES 添加液を供試し、1.0~2.0 $\text{kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ の間でパルス電界強度 5 水準を設定し、ヘテロカリオンの形成頻度を調査した。その結果、カルシウム添加液を用いた場合、3.1~8.2 % のヘテロカリオン形成率が得られた。

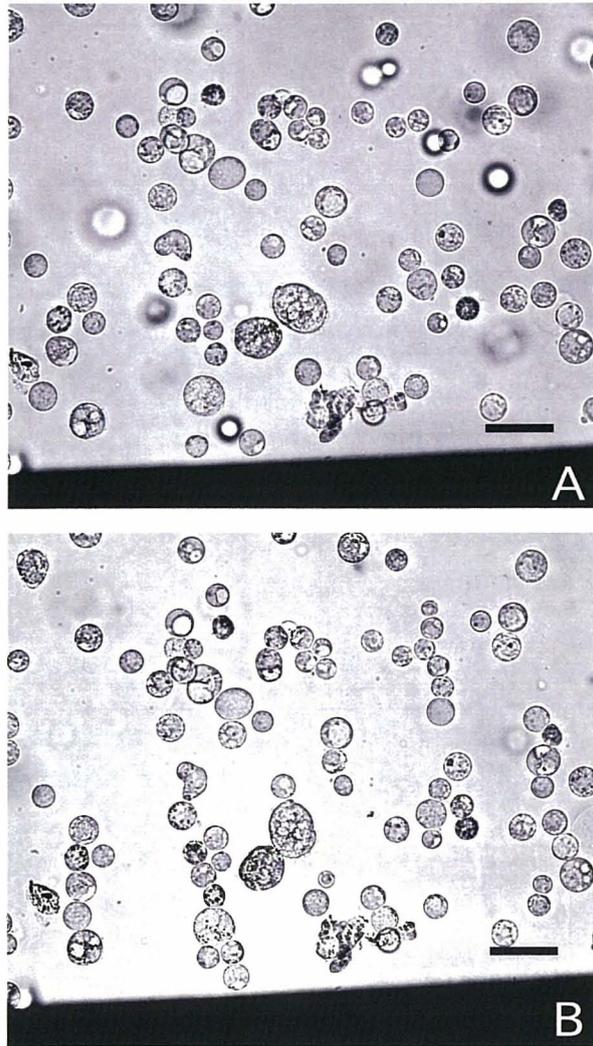


Fig. 4-1. Micrographs of pearl chain formation by the application of AC field in protoplasts of Japanese bunching onion. A: Before application of AC field, B: After application of AC field (1MHz -40 V for 1 min). Bottom shade in the figure shows an electrode of fusion chamber. Horizontal bar indicates 50 μ m.

Table 4-1. Effects of calcium ion and MES ^z on pearl-chain formation ^y in protoplasts of Japanese bunching onion and bulb onion.

Calcium concentration (mM)	Japanese bunching onion		Bulb onion	
	Without MES	With MES	With MES	With MES
0	+	+		+
0.5	±	±		+
1.0	-	±		+
2.5	-	±		-
5.0	-	-		-

^z 2(N-morpholino)ethanesulfonic acid ; 5 mM.

^y Degree of pearl-chain formation: +; highly formed, ±; slightly formed, -; not formed. Pearl-chain formation was investigated after application of 40V · 1 MHz AC field for 1 min.

一方、MES 添加液では、0 ~1.7%と前者に比べてその形成率は明らかに低かった。パルス電界強度についてみると、その強度が高いほどヘテロカリオン形成率は高いが、 $1.5 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 以上では8%前後と大差がなかった。パルス電界の印加時に顕微鏡観察を行った結果、 $1.75 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 以上のパルス電界を与えると、タマネギプロトプラストの破壊が多く、 $2.0 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ では特に顕著であった (Table 4-2.)。

4-2-3. 交流印加時間およびパルス幅

電氣的細胞融合のためのその他の2種の電気パラメーターについて検討した。交流印加時間については、20, 40 および 60 秒の時間を設定した。その結果、ヘテロカリオン形成率は、40 秒で最大となり 6.0%のヘテロカリオン形成率となった。60 秒では三重以上の多重融合が誘起され、ヘテロカリオン形成率は4.0%とむしろ低下した (Table 4-3.)。

一方、パルス幅はその幅が狭いほどヘテロカリオン形成率が高く、 50μ 秒のパルス幅で最大値 5.7%となった (Table 4-4.)。顕微鏡下で観察した結果、100 および 150μ 秒のパルス幅を用いると、ネギおよびタマネギプロトプラストの損傷が顕著で、 150μ 秒においては特に破裂するプロトプラストが多かった。

4-2-4. 細胞密度

ネギとタマネギプロトプラストを等量混合して、0.5, 1.0, 1.5 および 2.0×10^5 個 $\cdot \text{ml}^{-1}$ の細胞密度を設定し、未融合細胞、ヘテロカリオン、ホモカリオンおよび三重以上の融合細胞を調査した (Fig.4-2.)。

細胞密度を0.5, 1.0, 1.5 および 2.0×10^5 個 $\cdot \text{ml}^{-1}$ とすると、総融合細胞率はそれぞれ 9.8, 20.1, 24.4 および 27.2%と融合率が向上した。しかし、ヘテロカリオン形成率についてみると、 1.5×10^5 個 $\cdot \text{ml}^{-1}$ の細胞密度の場合に最高値 7.1%となった。 2.0×10^5 個 $\cdot \text{ml}^{-1}$ ではむしろ低下して 5.8%となった。また、細胞密度が高くなると、三重以

Table 4-2. Effects of pulse field strength and types of fusion solution on heterokaryon formation between Japanese bunching onion and bulb onion protoplasts ^z.

Pulse field strength (kV/cm)	Type of fusion solution ^y	
	With calcium	With MES
1.00	3.1 a	0.0 a
1.25	6.3 b	1.7 b
1.50	7.9 b	1.6 b
1.75	8.1 b	0.4 a
2.00	8.2 b	— ^x

^z Percent of heterokaryons out of total protoplasts. Data indicate mean values from three replications. Different letters in the identical column indicate significant differences at the 5 % level by Duncan's multiple range test.

^y Calcium; 0.5 mM, MES; 5 mM.

^x not tested.

Table 4-3. Effects of initial AC field time on heterokaryon formation between Japanese bunching onion and bulb onion protoplasts ^z.

Initial AC field time ^z (sec)	Heterokaryon formation ^y (%)
20	3.4
40	6.0
60	4.0

^z Initial AC field; 80 V—1 MHz.

^y Percent of heterokaryons out of total protoplasts. Data indicate mean values from three replications. Different letters in the column indicate significant differences at the 5 % level by Duncan's multiple range test.

Table 4-4. Effects of pulse width on heterokaryon formation between Japanese bunching onion and bulb onion protoplasts^z.

Pulse width ^z (μ sec)	Heterokaryon formation ^y (%)
50	5.7 b
100	5.3 b
150	2.7 a

^z Pulse field strength was applied at 1.5 kV/cm.

^y Percent of heterokaryons out of total protoplasts. Data indicate mean values from three replications. Different letters in the column indicate significant differences at the 5% level by Duncan's multiple range test.

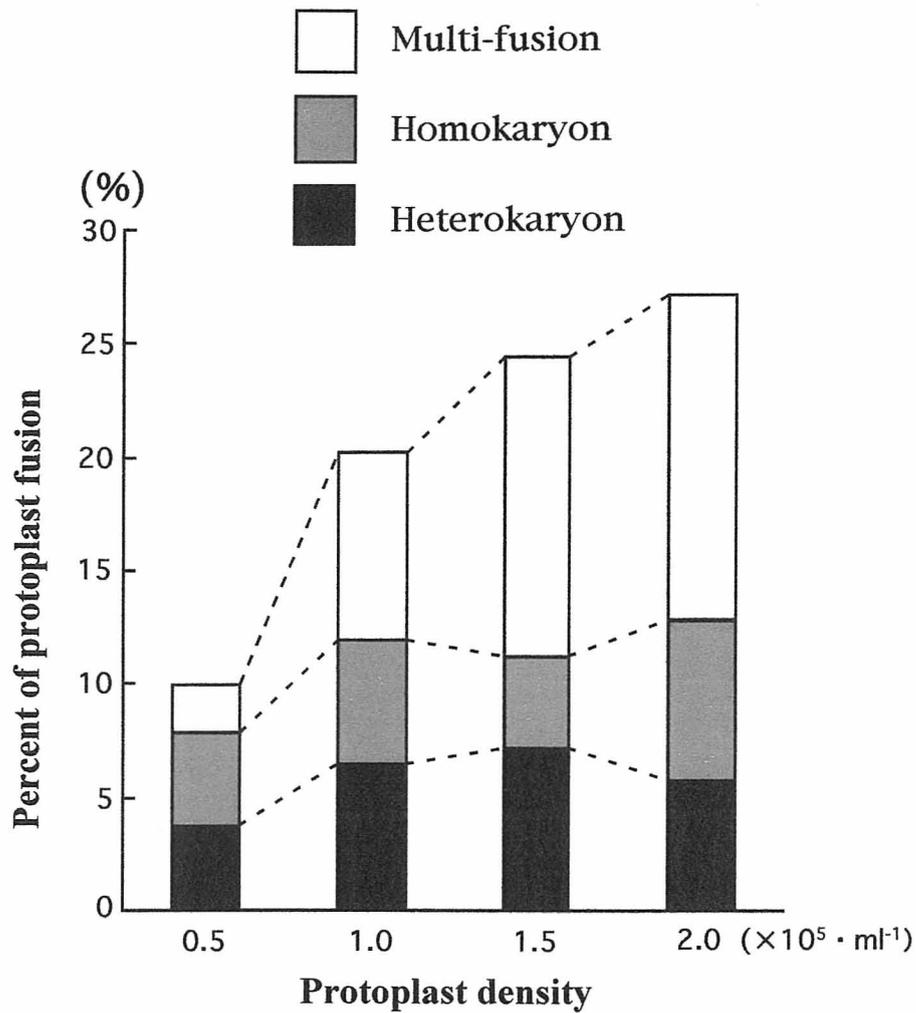


Fig. 4-2. Effects of protoplast density on fusion formation between Japanese bunching onion and bulb onion. Protoplast fusion was conducted by use of Shimadzu somatic hybridizer SSH-10 and fusion chamber FTC-64. Parameters of electrofusion: AC field, 1 MHz, $80 \text{ v} \cdot \text{cm}^{-1}$, 20 sec; DC field, $1.5 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$, 50 μ sec pulse width; two pulse treatments at a 10 sec interval. Data were mean values from four replications.

上の融合細胞が顕著に増大した。すなわち、 0.5×10^5 個・ ml^{-1} の場合、三重以上の融合率は 2.1% であるが、1.0, 1.5 および 2.0×10^5 個・ ml^{-1} では、それぞれ 8.3, 13.3 および 14.4% とその割合が高くなった。一方、ヘテロカリオン形成率は 4.0~7.0% と検討した細胞密度間では大差がなかった。

第 3 節 考 察

植物のプロトプラストは電気刺激により融合することが Senda et al.(1979)によって示されて以来、電気細胞融合の基礎技術の開発が進められた (Zimmermann and Scheurich, 1981)。電気細胞融合が開発される以前は、PEG (Kao and Michayluk, 1974) などの化学的処理によって細胞融合が行われ、一部の試験では現在でも利用されている。しかし、PEG は細胞発達に対して阻害的であり (Belarmino et al., 1996)、かつ、その取り扱いが煩雑であることから、ネギとタマネギとの体細胞雑種を作出するにあたっては電気細胞融合によることとした。

ネギとタマネギの細胞融合のみならず、一般にネギ属植物の細胞融合に関する報告は極めて少なく、唯一、Buiteveld et al.(1998)によってリーキとタマネギとの体細胞雑種が報告されているにすぎない。さらに、彼らの細胞融合は PEG によって行われており、ネギはもとよりネギ属植物の電気細胞融合の試験例はない。そこで、ネギとタマネギとの体細胞雑種の作出を目的として、再現性があり簡便な電気細胞融合技術の体系化を検討した。ネギとタマネギとの最適な電気細胞融合条件を明らかにするために、ネギは液体培養細胞由来の白色のプロトプラストを単離し、一方のタマネギは葉身由来の葉緑体を有するプロトプラストを利用することとした。このことによって、ネギとタマネギとの融合細胞 (ヘテロカリオン)、ネギあるいはタマネギ同士の融合細胞 (ホモカリオン) を判別し、数値化することができた。

細胞融合は、高周波電界によってプロトプラストが泳動する過程、

細胞同士が対合してパールチェーンが形成される過程，さらに一過性の方形波電界により接着したプロトプラスト同士が融合する過程の3段階を経て成立する(野田・十川, 1989). 細胞融合条件を確立するにあたって，まず，細胞懸濁液とパールチェーンの形成頻度に関する試験を行った. 細胞懸濁液の組成は，細胞の接着に有効とされる塩化カルシウム(Nea et al., 1987; 野田・十川, 1989)の濃度とpH安定化剤として頻用されるMESを組み合わせて検討した. 高周波電界を印加してパールチェーンの形成を促進するための細胞懸濁液としては，カルシウムの濃度は低濃度の0~0.5mMの範囲が適当であった. カルシウム濃度が2.5 mM以上では，プロトプラストの泳動はほとんど観察されなかった. 細胞懸濁液中のイオン濃度が高いとプロトプラストが元来有する荷電量が低下し，その結果，泳動力が低下したと考えられる(Zimmermann and Scheurich, 1981). 一方，MESの添加はカルシウム濃度が1~2.5 mMの条件下では，パールチェーン形成に有効であったが，カルシウム無添加あるいは0.5 mM添加の条件下では，その効果は明らかではなかった.

細胞の融合は方形電圧により誘起され，電気細胞融合においてはパルス電界強度が最も重要なパラメーターとされることから(野田・十川, 1989), 本条件について詳細に検討した. また，前試験に引き続きプロトプラスト間の融合を行う過程においても，細胞懸濁液組成についてさらに検討することとした. その結果，電気細胞融合のための細胞懸濁液としては0.5 mMの塩化カルシウム液が適当で，MESの添加によってヘテロカリオンの形成率が低下することが明らかとなった. パルス電界強度については， $1.5 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 以上でヘテロカリオン形成率は8%前後と大差かなかった(Table 4-2.). また， $1.75 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 以上では破裂するプロトプラストが多く観察されることから，好適なパルス電界としては， $1.50 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ が適当と考えられた.

その他の電気条件として，プロトプラストが泳動してパールチェーンが形成されるための交流印加時間を検討した. 60秒では5個以上の細胞がつながり，パルス電界を印加すると三重以上の融合細胞が多く

なった。従ってヘテロカリオン形成頻度は低下することが示され、40秒が適当と判断された (Table 4-3.)。さらに、パルス幅としては、50と100 μ 秒でヘテロカリオン形成率は5%以上と高かった。150 μ 秒では破裂するプロトプラストが顕著に多いことから、パルス幅が長いと融合細胞へのダメージが大きいと考えられた。実際の運用では、細胞融合率が高くダメージの少ない50 μ 秒が適当と判断された。

以上の細胞懸濁液および電気融合の好適条件を踏まえて、これまでに数値的な解析がなされていなかった細胞密度について検討した。細胞密度が高くなるにしたがって、全細胞融合率の向上した。その効果は主として三重以上の多重融合に起因していた。ヘテロカリオンを獲得するためには 1.5×10^5 個 \cdot ml⁻¹ の密度が適当で、7%以上のヘテロカリオン形成率となった (Fig.4-2.)。リーキとタマネギとのPEGによる細胞融合においては、約2%の融合率 (Buiteveld et al.,1998) が報告されていることに比較すると、極めて高率と考えられる。従来、細胞融合に際して細胞密度の設定は経験的に実施されていたが、当試験においては数値的に解析し最適密度を決定することができた。

以上のように、ネギとタマネギとの電気細胞融合を行うための基礎となる知見が得られ、これらを組み合わせることによって再現性があり、かつ、効率的な細胞融合法が確立したものと考えられる。前章のネギプロトプラストからの植物体再生系に従い、ネギとタマネギとの融合細胞を培養することによって、体細胞雑種の育成が実現可能と考えられる。

第4節 摘要

本章では、ネギとタマネギとの体細胞雑種の獲得を目指して、効率的で再現性のある電気細胞融合条件について検討した。細胞懸濁液の組成、電気融合のためのパラメーター、および細胞密度の各要因の水準を組合わせた実験を行い、これらの最適条件を明らかにした。得られた結果は以下のとおりである。

- (1) 懸濁培養細胞由来の白色のネギプロトプラストと葉緑体を有する葉身由来のタマネギプロトプラストとを用いて、細胞融合試験を行った。その結果、両者が融合したヘテロカロンの判別が可能となった。
- (2) 電気細胞融合のための細胞懸濁液としては 0.5 mM の塩化カルシウム液が適当であった。
- (3) 電気融合条件として、パルス電界強度は $1.50 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、交流印加時間は 40 秒、またパルス幅は 50μ 秒がそれぞれ最適と考えられた。
- (4) ヘテロカロンを獲得するためには 1.5×10^5 個 $\cdot \text{ml}^{-1}$ のプロトプラスト密度が適当で、この条件で 7% 以上のヘテロカロンが形成された。

第V章 ネギとタマネギの体細胞雑種の育成

第III章でネギのプロトプラストからの植物体再生系を確立し、さらに続く第IV章では、ネギとタマネギとの効率的な電気細胞融合法を明らかにした。

本章では、第III章および第IV章で確立した手法により、ネギとタマネギとの体細胞雑種の開発を検討する。同時に、近年急速に発展したDNA解析技術を応用して、得られた体細胞雑种植物の核および細胞質ゲノムの動向を明らかにする。

第1節 材料および方法

5-1-1. 供試品種およびそのプロトプラストの単離

鳥取県園芸試験場で選抜・育成された‘伯州ネギ’系の品種で、中生品種‘改良伯州5号’(*Allium fistulosum* L., $2n=2x=16$)および早生品種‘早どり伯州’(*A. fistulosum* L., $2n=2x=16$)を用いた。一方の融合親として、細胞質雄性不稔(CMS)遺伝子を持つタマネギ(*A. cepa* L., $2n=2x=16$)品種‘せきほく’(宮浦ら, 1985)を用いた。ネギおよびタマネギのプロトプラストは第III章で確立した懸濁培養細胞から単離した。

5-1-2. ネギの細胞質の不活性化

ネギ2品種の細胞質の不活性化は、両品種のプロトプラストに種々の濃度のヨードアセトアミド(IOA)処理を行い、最適なIOA濃度を検索した。その処理濃度は、0, 2.5, 5, 10 及び 20 mM とした。ネギプロトプラストを単離した後、0.63 M マニトール, CPW 無機塩 (Frearson et al., 1973) および 5 mM MES を含み pH を 5.8 に調整したそれぞれの濃度の IOA 液にネギプロトプラストを懸濁し、4 °C,

15 分間の処理を行った。処理を完了したプロトプラストは、プロトプラスト培養培地で 2.0×10^5 個 $\cdot \text{ml}^{-1}$ の細胞密度とし、その 2.5 ml を 6 cm 径の滅菌プラスチックシャーレに注入し培養を行った。45 日間の培養の後、形成されたコロニー数を肉眼で計測し、IOA 濃度が 0 mM のコロニー形成数を対照として、それぞれの IOA 濃度処理を行って形成されたコロニー形成数の百分率を算出した。

5-1-3. 電気細胞融合条件

タマネギおよび IOA 処理を行ったネギプロトプラストはそれぞれを 3.0×10^5 個 $\cdot \text{ml}^{-1}$ の細胞密度となるように細胞融合液に懸濁した。細胞融合液は第 IV 章で確立した 0.5 mM 塩化カルシウムを含む 0.71 M マニトール液 (pH 5.8) を用いた。ネギとタマネギのプロトプラスト懸濁液を 1 : 1 の比率で混合し、その 0.8 ml を融合チャンバー FTC-64 (島津) に注入した。これを細胞融合装置 SSH-10 (島津) に装着して電気融合処理を行った。電気融合条件は第 IV 章で確立した好適値を踏まえて次のとおりとした。すなわち、交流周波数 1 MHz, 交流初期印加電圧 80 V, 交流初期印加時間 40 秒, パルス幅 50 μ 秒, パルス電界強度 $1.5 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$, 交流 2 次印加電圧 80 V, パルス印加間隔 10 秒, 印加パルス回数 2 回の条件とした。

5-1-4. 融合細胞の培養および植物体の再生

プロトプラスト融合を行い室温で 20 分間静置した後、融合チャンバー底部に沈降した融合処理プロトプラストを回収し、培養に供した。融合処理を行ったプロトプラストの他に、IOA 処理および無処理のネギプロトプラストと、タマネギプロトプラストも対照として培養を行った。培養は第 III 章で確立した方法に従った。

培養 45 日前後に、融合処理を行ったプロトプラスト由来のコロニーをカルス形成培地に移植し、さらに 2 週間培養を継続した。カルス形

成培地上で 2 mm 以上に発達したカルスは再分化培地を注入固化したプラントボックス (Iwaki) に移植して植物体の再生を図った。2 ヶ月間あるいは引き続き 2 ヶ月間の培養で形成されたシュートは、植物生長調節剤を含まない 1/2N-MS 培地 (第 III 章) に移植して植物体の発達を促した。

5-1-5. 細胞遺伝学的解析

融合処理を行って得られた 12 個体の植物およびその融合親について、その葉身を材料として相対的な DNA 含量の測定を行った。分析機器はフローサイトメーター PA-type (PARTEC) を利用し、機器メーカーのマニュアルに従って材料の調製をした。また、培養容器中で生育が旺盛な 2 個体について、その根端細胞の染色体数を調査した。その方法は中崎 (1995) の方法に従ったが、細胞の同調時間を 24 時間から 48 時間に修正した。染色体数は有糸分裂期の 3 細胞以上について調査した。

5-1-6. 葉緑体および核 DNA の解析

ネギ '改良伯州 5 号' および '早どり伯州', タマネギ 'せきほく', およびこれらを融合処理して得られた植物体 16 個体を供試して、葉緑体および核 DNA の解析検討した。

各供試材料の葉身 0.1 g から、ISOPLANT (ニッポンジーン) を用いて DNA を抽出した後、RNase 処理により RNA を除去した。これらの DNA サンプルを、以下の葉緑体および核 DNA の解析のための鋳型として用いた。

葉緑体 DNA の解析は、Yamashita ら (1998) の報告に若干の修正を加えて行った。まず、葉緑体 DNA の *rbcL*-ORF106 領域 (約 3.2 kb) を増幅するプライマーを用いて PCR を行った。PCR 反応は、鋳型 DNA 130 ng, プライマー 36 pmol, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.1 mM, LA *Taq*

DNA polymerase (TaKaRa) 1.25 unit, および LA *Taq* DNA polymerase 添付バッファーを含む 50 μ l の反応液で行った。反応条件は, 92 $^{\circ}$ C で 30 秒間の予備変性を行い, 92 $^{\circ}$ C で 1 分間, 55 $^{\circ}$ C で 1 分間, および 70 $^{\circ}$ C で 4 分間の反応を 30 サイクル行った後, 70 $^{\circ}$ C で 7 分間の最終伸長を行った。増幅産物を Quantum Prep PCR Kleen Spin Columns (BIO-RAD) で精製した後, *Alu* I, *Ase* I, *Hinf* I, *Pst* I, および *Taq* I (ニッポンジーン) で消化した。これらを, 2.0% アガロースゲル (Agarose X, ニッポンジーン) を用いて電気泳動を行い, エチジウムブロマイドで染色した後, 制限酵素による消化パターンを画像解析装置 (FMBIO II) で観察した。

核 DNA の解析は PCR-RFLP および RAPD 法によって実施した。PCR-RFLP 法は, Buiteveld ら(1998)の報告に若干の修正を加えて行った。まず, リボゾーム DNA の Internal transcribed spacer region (ITS 領域, 約 0.7 kb) を増幅するプライマーを用いて PCR を行った。PCR 反応は, 鋳型 DNA 100 ng, プライマー 50 pmol, dNTPs 0.4 mM, KOD Dash DNA polymerase (TOYOBO) 1 unit, および KOD Dash DNA polymerase 添付バッファーを含む 50 μ l の反応液で行った。反応条件は, 94 $^{\circ}$ C で 1 分間の予備変性を行い, 94 $^{\circ}$ C で 1 分間, 50 $^{\circ}$ C で 1 分間, および 72 $^{\circ}$ C で 2 分間の反応を 35 サイクル行った後, 72 $^{\circ}$ C で 5 分間の最終伸長を行った。増幅産物を Quantum Prep PCR Kleen Spin Columns (BIO-RAD 社製) で精製した後, *Dde* I (NEW ENGLAND Biolabs 社製) で消化した。これらを 2.0% アガロースゲル (Agarose X, ニッポンジーン) を用いて電気泳動を行い, エチジウムブロマイドで染色した後, 制限酵素による消化パターンを画像解析装置 (FMBIO II) で観察した。

5-1-7. ミトコンドリア DNA の解析

サザンブロット法によるミトコンドリア DNA の解析を行った。供試材料はガラス温室内で育成したネギ ‘改良伯州 5 号’ 2 個体, タマネ

ギ‘せきほく’ 2 個体，およびこれらのプロトプラスト融合を行って得られた個体‘KS - 1’とした．それぞれの個体の葉身 3.0 g を量り取り，Dneasy Plant Maxi Kit (Quiagen) により全 DNA を抽出した．その方法はメーカーのマニュアルに従った．

各材料の DNA 10 μ g を制限酵素 *Eco* R I で完全消化した後，これらをフェノール・クロロホルムで処理し，上清をエタノール沈澱して精製した．完全消化したゲノム DNA を 1% アガロースゲルで 30 V で 13 時間泳動後し，ナイロンメンブレン(Hibond N+, アマシヤムバイオテック)にバキュームブロッティング装置を用いてトランスファーした．ブロッティング装置にゲルを乗せバキュームポンプで 40 cmH₂O で吸引しながら 0.25 M HCl をゲル上に注ぎ，4 分間脱プリンした．同様に吸引しながら変性液 (0.5 M NaOH, 1.5M NaCl) で 4 分間変性し，さらに，中和液 (1 M Tris · HCl, 2 M NaCl , pH 5.0) で 4 分間中和した．この後，20×SSC でゲルを覆い 1 時間吸引しトランスファーした．トランスファー終了後，80°C で 10 分間乾燥させ，UV でクロスリンク (50 mJoule/794 cm²) させた．イネのミトコンドリアに特異的な遺伝子 *cox* I (Cytochrome oxidase subunit I) を含むクローンの挿入断片のみを PCR で増幅した．増幅した DNA 断片は電気泳動後ゲルから切り出して Prep-A-Gene DNA Purification Matrix(BIO RAD) を用いて精製した．精製法はマニュアルに従った．精製した DNA 断片は AlkPhosDirect(アマシヤムバイオテック)を用いて，マニュアルに従ってラベリングした．ハイブリダイゼーションは，AlkPhosDirect(アマシヤムバイオテック)を用い，メーカーのマニュアルに従い実施した．

第 2 節 結 果

5-2-1. ネギの細胞質の不活性化

ネギプロトプラストの細胞質を不活性化することによって，ネギとタマネギとの融合細胞を選択的に発達させるための IOA 処理濃度を検

索した。その結果を Fig. 5-1. に示した。

供試した 2 品種のプロトプラストの反応に相違が観察された。2.5 mM の IOA 濃度では、‘改良伯州 5 号’は対照の約 6 % のコロニー形成頻度であったのに対し、‘早どり伯州’は対照よりも多い 106 % となった。5 mM の IOA 濃度では、両品種ともその頻度が 34 % 以下と顕著に低下し、10 mM 以上ではほとんどコロニーの形成は認められなかった。プロトプラストからのコロニー形成を完全に阻止するための IOA 濃度は‘改良伯州 5 号’および‘早どり伯州’で異なり、それぞれ 10, 20 mM であった。

5-2-2. ネギとタマネギとのプロトプラスト融合とその培養

ネギ‘改良伯州 5 号’とタマネギ‘せきほく’およびネギ‘早どり伯州’とタマネギ‘せきほく’の間の 2 種の組合わせで、合計 78 回のプロトプラスト融合試験を行った。さらに、IOA 処理および無処理のネギプロトプラストとタマネギプロトプラストについても、対照として培養を行った。

その結果を Table 5-1. に示した。‘改良伯州 5 号’を用いた場合は、IOA 処理を行わないとシャーレ当たり平均 69.2 個のコロニーが形成された。10 mM の IOA 処理を行うとコロニー形成は観察されなかった。42 回の融合試験を行ったプロトプラストからは、平均 6.1 個のコロニーが発達し、合計 249 個のコロニーが得られた。

一方、‘早どり伯州’の場合は、IOA 処理を行わないとシャーレ当たり 500 個以上のコロニーが形成され、正確なコロニー形成数の計測は不可能であった。IOA 処理を行ったプロトプラストは、10 回の培養試験中に 1 個のコロニーの発達が認められた。‘早どり伯州’では、37 回の融合試験で平均 4.7 個のコロニーが形成され、合計 168 個のコロニーが得られた (Fig. 5-2.)

上記の試験と平行して、タマネギプロトプラストの培養を行った結果、21 回の培養試験を通じてコロニーの形成は皆無であった。

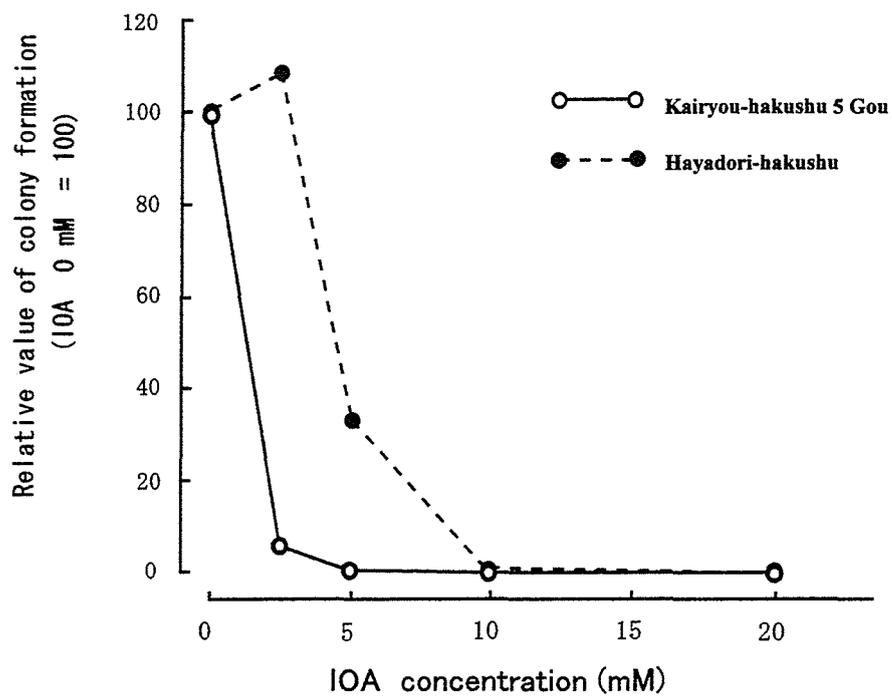


Fig. 5-1. Effects of iodoacetamide (IOA) on colony formation from protoplasts in Japanese bunching onion cv. 'Kairyō-hakushu 5 Gou' and 'Hayadori-hakushu'. Colonies in 6 cm dish were scored after 45 days of culture. The data were expressed as percentages over the control (100 % at IOA 0 mM); each point represents relative mean value of colony numbers from three replicates.

Table 5-1. Colony formation from protoplast fusion between Japanese bunching onion and bulb onion

Host cultivar and its protoplast treatment ^z	No. of experiments	Colonies/experiment ^y	Total colonies obtained
Kairyuu-Hakushu 5 gou			
Control protoplasts	11	69.2 ± 64.1	761
IOA treated protoplasts	14	0.0 ± 0.0	0
Fusion treated	42	6.1 ± 6.9	249
Hayadori-Hakushu			
Control protoplasts	9	500 <	4500 <
IOA treated protoplasts	10	0.1 ± 0.3	1
Fusion treated	36	4.7 ± 3.1	168

^z Control protoplasts indicate host cultivar's protoplasts. IOA was used for control protoplasts at the concentration of 10 and 20 mM in 'Kairyuu-Hakushu 5 gou' and 'Hayadori-Hakushu', respectively. Onion protoplasts were isolated from calli of onion cv. 'Sekihoku'. Protoplast fusion was conducted between IOA treated protoplasts and bulb onion protoplasts.

^y Colonies developed from 5×10^5 protoplasts or 1.2×10^5 fused protoplasts in 6 cm dish were counted after 45 days culture. For protoplast culture of bulb onion, no colony was detected.

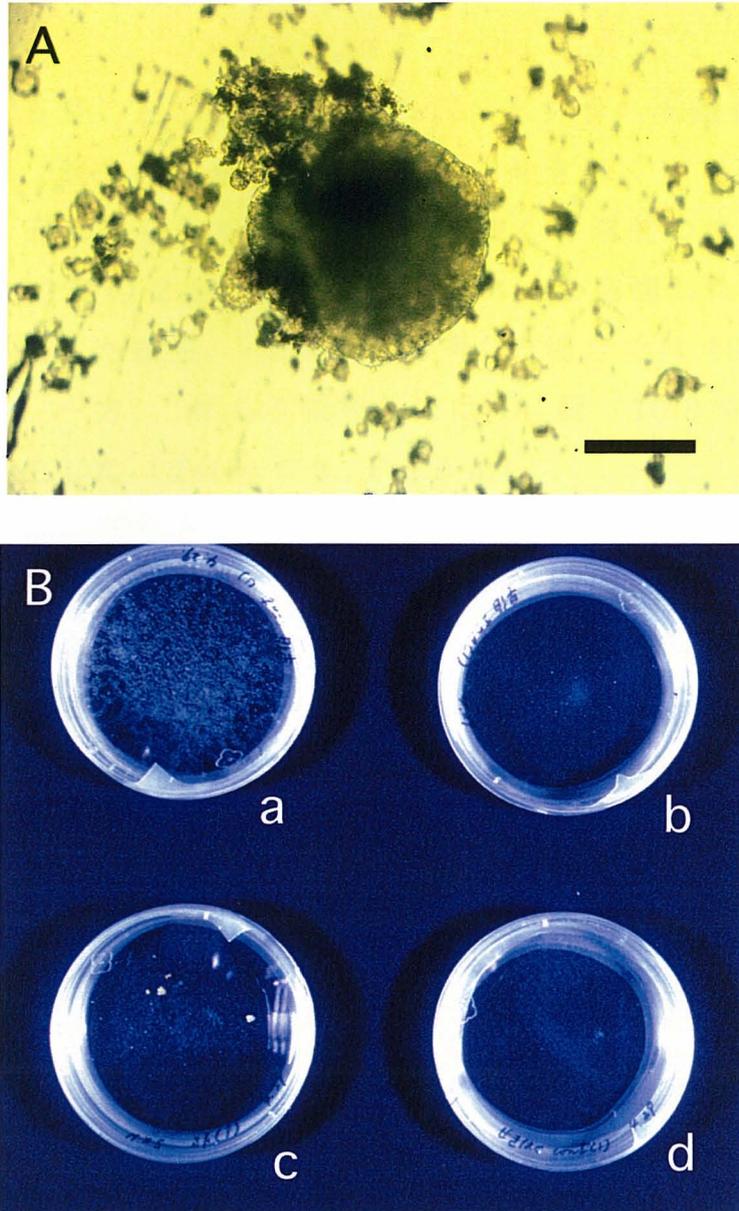


Fig. 5-2. Photographs of colony development from protoplast fusion between Japanese bunching onion cv. 'Kairyō-hakushu 5 Gou' and bulb onion cv. 'Sekihoku'. (A) Colony development from fusion products after a month culture, scale bar expresses 200 μ m. (B) Colony formation after 45 days culture; (a) in the figure shows control protoplast culture of Japanese bunching onion, (b) IOA-treated protoplast culture of Japanese bunching onion, (c) culture of protoplast fusion between IOA-treated Japanese bunching onion and bulb onion. (d) control protoplast culture of bulb onion.

5-2-3. カルス形成および植物体の再生

‘改良伯州 5 号’ と ‘せきほく’ のプロトプラスト融合では 249 個のコロニーが、他方の ‘早どり伯州’ と ‘せきほく’ では 168 個のコロニーがそれぞれ得られた。これらは引続く 2 週間の培養で、それぞれ 196 個と 129 個の 2 mm 大以上のカルスへと発達した。カルスを再分化培地に移植した結果、‘改良伯州 5 号’ の場合では 19 個体 (9.7%) のカルスから、一方、‘早どり伯州’ では 14 個 (10.9%) のカルスから植物体が再生した (Table 5-2., Fig.5-3.).

以上のように、プロトプラスト融合試験で合計 33 個体の植物が 4 ヶ月間の再分化試験中に獲得されたが、約半数の個体は約 1 年の培養期間で維持増殖が不可能であった。すなわち、発根不良、葉身のねじれ、および生育遅延などの種々の奇形が観察された。その中で旺盛な生育を示し、かつ、十分な発根が認められた HS-8 と KS-1 の 2 個体は、ガラス温室内に設置したポットでの栽培が可能であった。

HS-8 は形態的にはネギのそれと類似するが、その葉を水平に切除した断面は半円型であり、ネギの円型あるいはタマネギの三角型とは異なった (Fig. 5-4.). 一方の KS-1 は、ネギ型の円型の葉身を有するが、地下部には約 4 cm 径の球根の形成が観察された。

5-2-4. 細胞遺伝学的解析

融合親と再分化植物体 12 個体について、フローサイトメーターにより核 DNA 量の分析を行った。その分析結果を Fig. 5-5. および Fig. 5-6. に示した。ネギの最初に出現するピークを横軸の 50 の値に設定すると、タマネギは 50-60 の値で最初のピーク (第 1 ピーク) が検出された。ネギ ‘改良伯州 5 号’ とタマネギ ‘せきほく’ との組合わせをみると (Fig. 5-5), KS-6 および KS-7 は 50 前後に第 1 ピークが検出された。ただし、KS-7 は第 2 番目のピーク (第 2 ピーク) は第 1 ピ

Table 5-2. Callus development and plant regeneration from protoplast fusions between Japanese bunching onion and bulb onion.

Cultivars	No. of colonies	No. of calli developed ^z	No. of calli regenerated ^y	A / B (%)
		(A)	(B)	
Kairyuu-Hakushu 5 Gou	249	196	19	9.7
Hayadori-Hakushu	168	129	14	10.9

^z Colonies that developed from fused protoplast were cultured for 2 - 3 weeks on the callus induction medium. Calli more than 2 mm in diameter were counted.

^y Calli with shoots were recorded after a four-month culture.

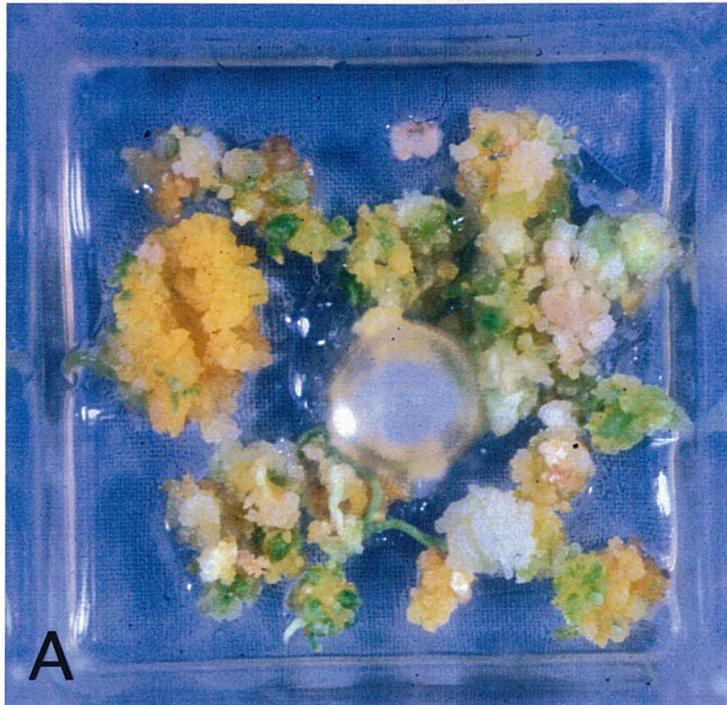
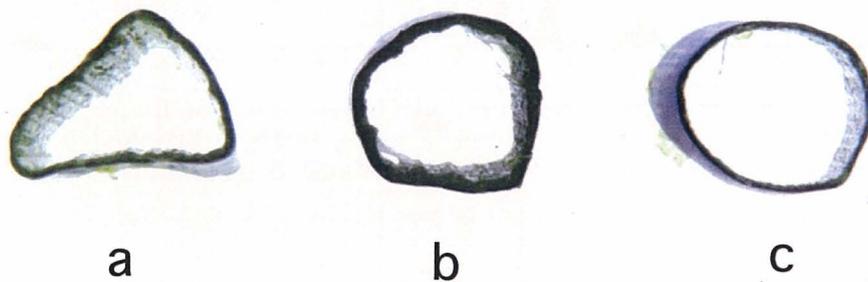
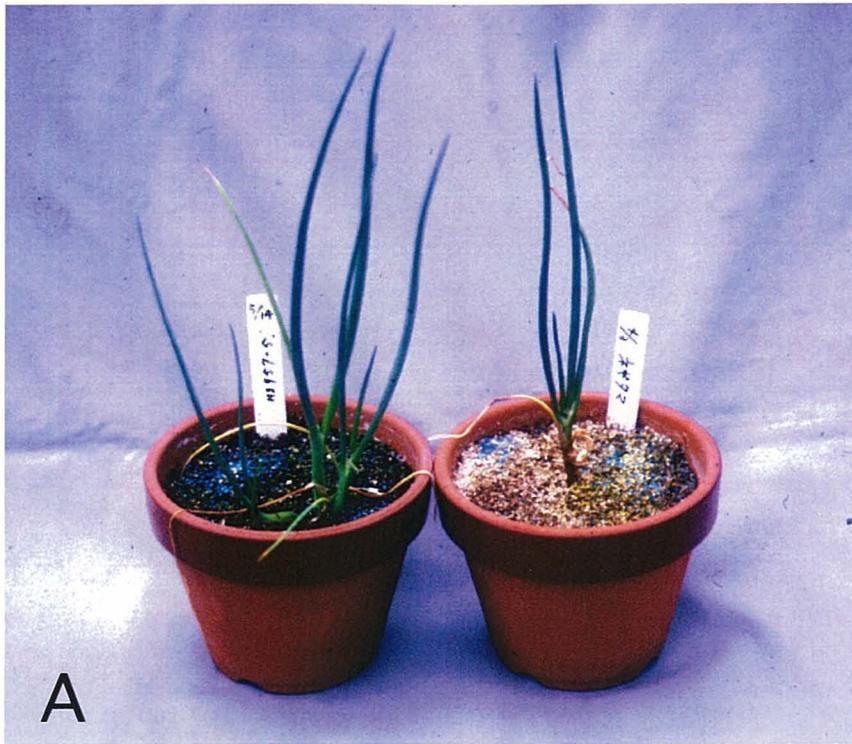


Fig. 5-3. Photographs of plant regeneration from fusant calli between Japanese bunching onion cv. 'Kairyō-hakushu 5 Gou' and bulb onion cv. 'Sekihoku'. (A) Development of shoots from fusant calli, (B) Whole plant regeneration.



B

Fig. 5-4. Morphology of regenerated plants from protoplast fusion between Japanese bunching onion and bulb onion. (A) Acclimated plants in a greenhouse, (B) Leaf blade of regenerated plant and its fusion parents; (a) indicates bulb onion cv. 'Sekihoku', (b) regenerated plant HS-8, (c) Japanese bunching onion cv. 'Hayadori-hakushu'.

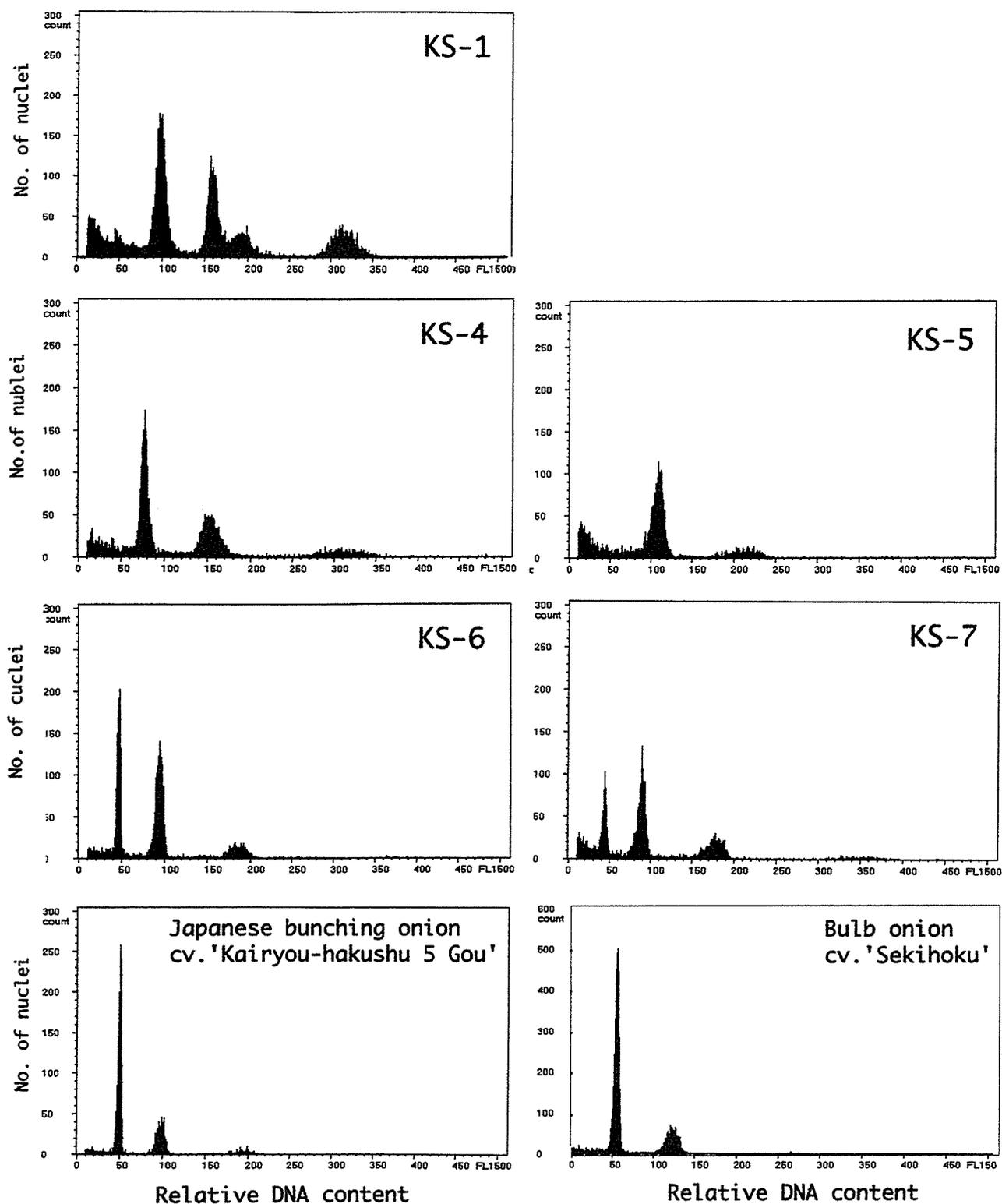


Fig. 5-5. Flow-cytometric analysis of nuclear DNA content in regenerant plants derived from protoplast fusion between Japanese bunching onion cv. 'Kairyō-hakushu 5 Gou' and bulb onion cv. 'Sekihoku'. KS1, 4, 5, 6, and 7 indicate regenerant plant lines.

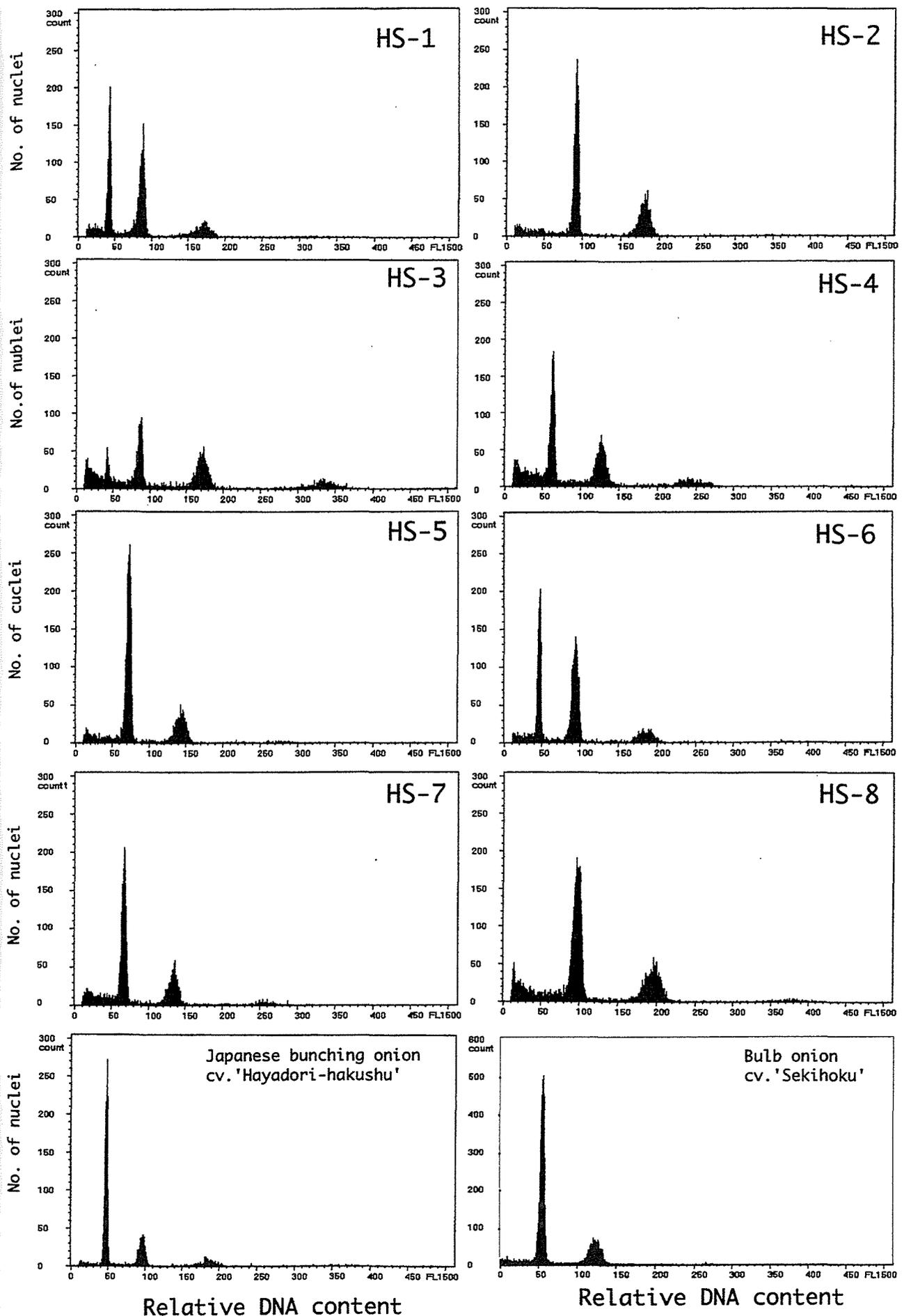


Fig. 5-6. Flow-cytometric analysis of nuclear DNA content in regenerant plants derived from protoplast fusion between Japanese bunching onion cv. 'Hayadori-hakushu' and bulb onion cv. 'Sekihoku'. HS-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8 indicate regenerant plant lines.

ークよりも高かった。KS-4は75前後に第1ピークが出現した。KS-1およびKS-5は約100前後に第1ピークがあった。

これらの結果から、2倍体ネギを2Cと表記すると、KS-6は2C、KS-7は2C+4C、KS-4は3C、KS-1およびKS-5は4Cと、それぞれが表記される (Table 5-3)。

他方のネギ‘早どり伯州’とタマネギ‘せきほく’との組合わせでは、HS-1、HS-3、HS-4、HS-5、HS-6、およびHS-7は50前後に第1ピークが検出された。ただし、これらの中でHS-1、HS-3、およびHS-6の3個体は第1と第2のピーク差がほとんどなかった。HS-2およびHS-8の2個体は100前後に第1ピークが検出された。前記と同様にネギの倍数性を2Cとすると、HS-4、HS-5およびHS-7は2C、HS-1、HS-3およびHS-6の3個体は2C+4C、HS-2およびHS-8の2個体は4Cとそれぞれ表記される (Table 5-3.)。

次に、KS-1およびHS-8の2個体について、染色体数を調査した。その結果、再分化植物のKS-1およびHS-8の2個体は両者ともに、 $2n=32$ 本の染色体を有していた (Fig. 5-7.)。

5-2-5. 核DNAの解析

Buiteveld et al. (1998)の方法に若干の修正を加えて、融合親と再分化植物16個体の核DNAの解析を行った。供試したすべての融合親および再分化植物において、予想される約0.7kbpのITS領域が増幅された。前記の報告に従ってDdeIで切断した結果をFig. 5-8.に示した。融合親のネギとタマネギとでバンドの相違が認められた。すなわち、ネギのITS領域はDdeIで切断されなかったのに対し、タマネギのそれは切断されて約200と500bpの2本のDNA断片となった。再分化個体の中で、KS-1およびHS-8の2個体は約200, 500および700bpの3本のDNA断片が検出された。他の14個体はすべて700bpのみが検出され、ネギのそれと同一であった。

Table 5-3. *In vitro* growth and flow cytometric analysis of plants derived from protoplast fusion between Japanese bunching onion and bulb onion

Cultivars and regenerated plants	<i>In vitro</i> growth ^z		Flow cytometric analysis ^y	Note
	Leaf	Root		
Kairyō-Hakushu 5 Gou				
KS-1	+	+	4 C	
KS-2	±	-	nt ^x	
KS-3	-	-	nt	died
KS-4	±	±	3 C	
KS-5	±	-	4 C	
KS-6	+	-	2 C	
KS-7	±	±	2 C + 4C	
KS-8	±	-	nt	vitricated
Hayadori-Hakushu				
HS-1	±	-	2 C + 4 C	
HS-2	+	±	4 C	
HS-3	+	±	2 C + 4 C	
HS-4	-	+	2 C	
HS-5	±	±	2 C	
HS-6	+	-	2 C + 4C	
HS-7	+	+	2 C	
HS-8	+	+	4 C	

^z Growth: + vigorous, ± moderate, - depressed

^y DNA content is expressed as fluorescence intensity. C-value of Japanese bunching onion is 2 C.

^x not tested



Fig. 5-7. Metaphase plate of root tip cells from fusant plant HS-8; $2n = 4x = 32$.

M fK fH cS 1 2 3 4 5 6 7 8 M
 HS-1 HS-2 HS-3 HS-4 HS-5 HS-6 HS-7 HS-8 M

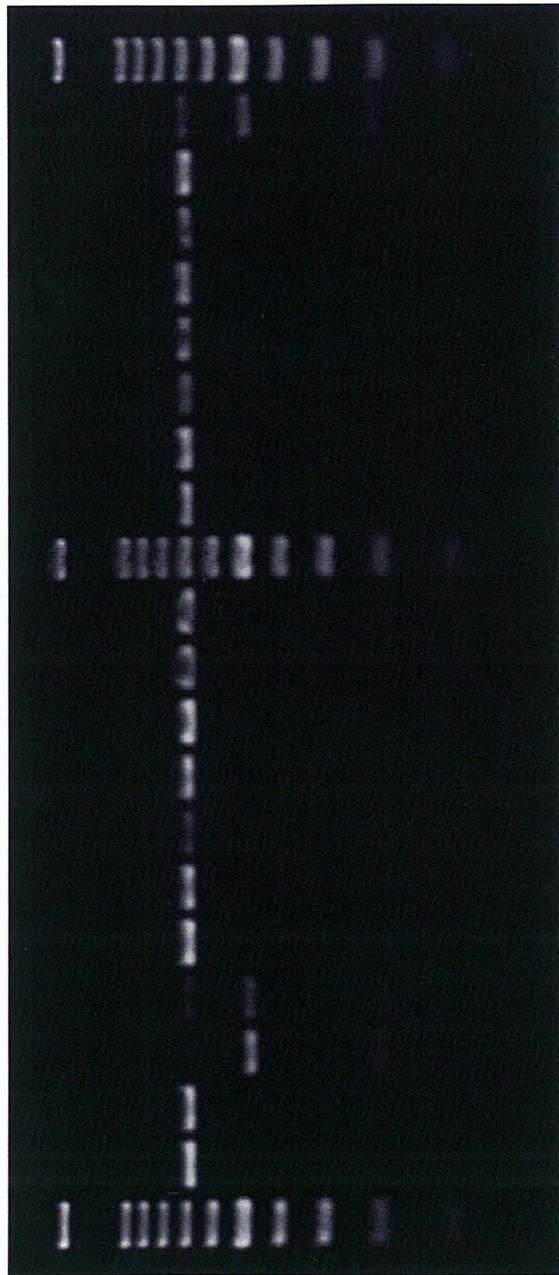


Fig. 5-8. Restriction patterns of the *Dde* I - digested rDNA ITS region in *Allium fistulosum* cv. 'Kairyō-Hakushū 5 Gou' (fK) and 'Hayadori-Hakushū' (fH), *A. cepa* cv. 'Sekihoku' (cS), and regenerated plants. KS and HS plants are shown in Table 1.. M: DNA size markers with a 100 to 1000 bp ladder and 1500 bp.

5-2-6. 葉緑体 DNA の解析

Yamashita et al.(1998) の報告に若干の修正を加えて、融合親と再分化植物個体の葉緑体 DNA に特異的に座する *rbcL*-ORF106 領域の解析を行った。*rbcL*-ORF106 領域を増幅するプライマーを添加して PCR を行った結果、供試したすべてのサンプルで予想される 3.2 kbp の DNA 断片が得られた。ネギとタマネギからの増幅産物を *Alu* I, *Ase* I, *Hinf* I, *Pst* I および *Taq* I の 5 種の制限酵素を用いて消化を検討した。その結果、*Taq* I においてのみネギとタマネギの相違が認められた。すなわち、ネギは約 900 bp の DNA 断片が検出されるが、タマネギではこの断片は検出されず、約 800 bp の断片が検出された。この結果を踏まえて、再分化植物個体の分析を行った。その結果を Fig. 5-9. に示した。ネギ‘改良伯州 5 号’とタマネギ‘せきほく’の組合わせでは、KS-1 個体のみがタマネギタイプで、他の 7 個体はネギタイプであった。一方、ネギ‘早どり伯州’とタマネギ‘せきほく’の組合わせでは、HS-1, HS-2 および HS-3 の 3 個体はタマネギタイプであり、他の 5 個体はネギタイプであった。

5-2-7. ミトコンドリア DNA の解析

サザンブロット法により再分化植物個体 KS-1 のミトコンドリアについて分析を行った。その結果を Fig.5-10.に示した。ネギ‘改良伯州 5 号’では約 700 bp で *cox* I とのハイブリダイズ像が検出された。一方、タマネギ‘せきほく’では約 500 bp であった。再分化植物個体の場合は、約 450 と 700 bp の 2 本のバンドが検出された。

第 3 節 考 察

融合細胞のみが選択的に発達するシステムが構築されるならば、その後の融合細胞の培養や引続く植物体の再生実験は簡便化され、きわ

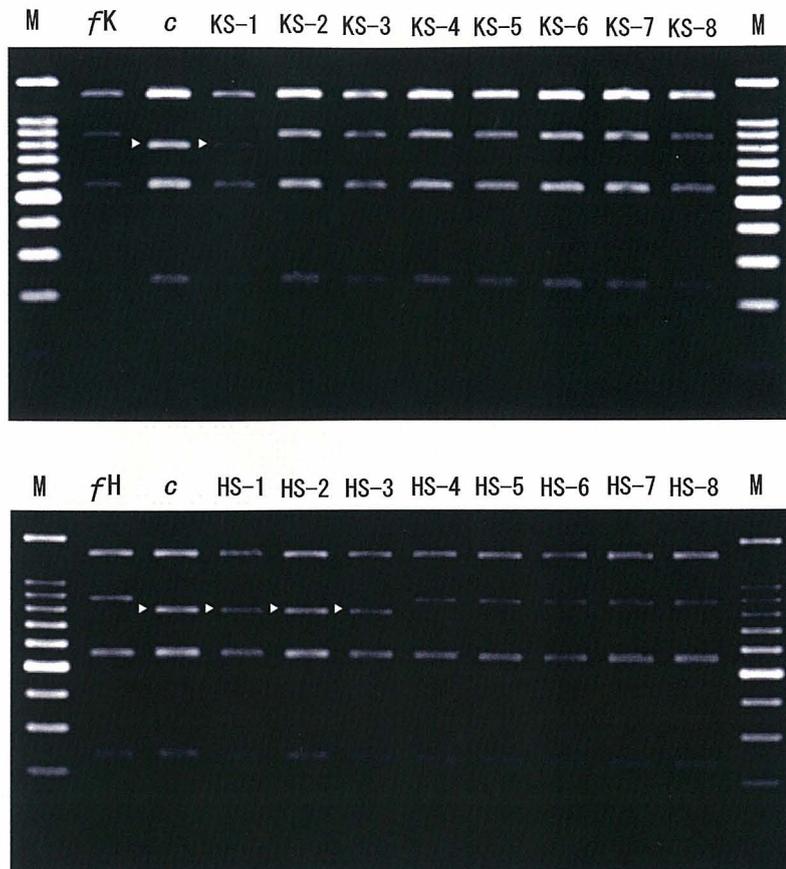


Fig. 5-9. Restriction patterns of the *Taq* I - digested *rbcL*-ORF 106 region of cpDNA in *Allium fistulosum* cv.

'Kairyō-Hakushu 5 Gou' (*fK*) and 'Hayadori-Hakushu' (*fH*), *A. cepa* cv. 'Sekihoku' (*c*), and regenerated plants. KS and HS plants are shown in Table 3. M: DNA size markers with a 100 to 1000 bp ladder and 1500 bp. The white arrows in the figure indicate *A. cepa* specific bands.

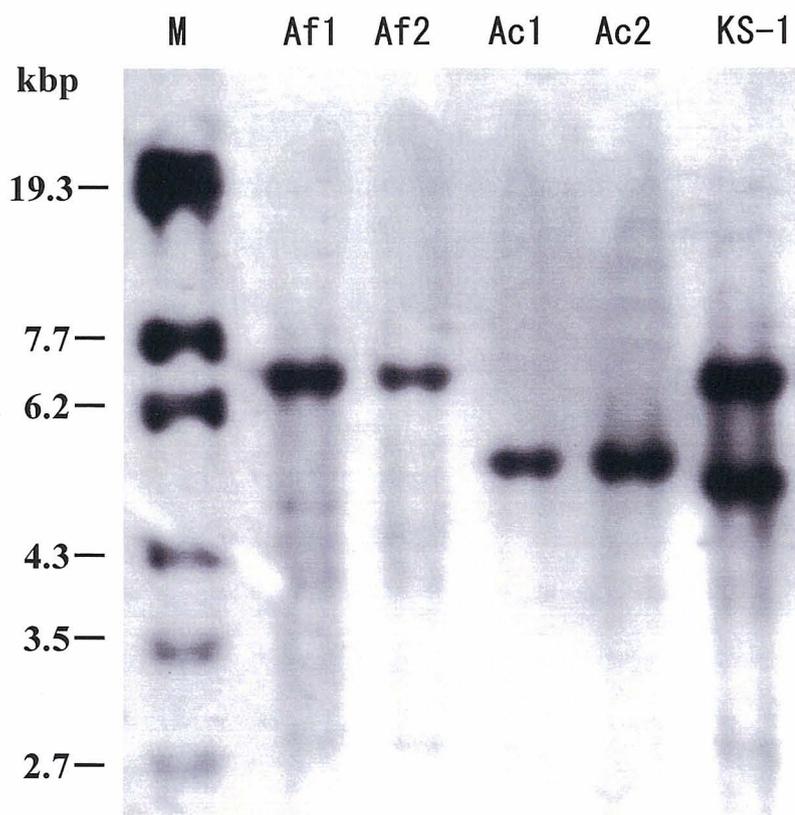


Fig. 5-10. A profile of southern blot hybridization. Total DNA was extracted from each plant and digested with *Eco* R I . Mitochondria-specific DNA fragment, *cox* I , was used as a probe.

Af1 and Af2 : Japanese bunching onion

Ac1 and Ac2 : Bulb onion

KS-1: Fusant plant

M : DNA marker (λ *Sty* I)

めて効率的な体細胞雑種の獲得が可能となる。本章では、まず最初に IOA によるネギプロトプラストの不活性化条件を詳細に検討した。すなわち、タマネギプロトプラストは、第Ⅲ章で確立したネギプロトプラストのための培地中では増殖しない。従って、IOA で処理したネギプロトプラストとタマネギプロトプラストとの融合処理を行うと、異種間融合したプロトプラストはその代謝機能が補完され、ヘテロカロンのみが選択的に分裂増殖することが期待される。Nehls (1978) は代謝阻害剤として IOA に着目し、対称細胞融合あるいは非対称細胞融合において本剤を最初に利用した。それ以降、多くの植物の細胞プロトプラストで濃度と処理時間の検討がなされた。セイヨウアブラナでは 3mM-3 分間 (Liu et al., 1996) あるいは 7 mM-10 分間 (Sakai et al., 1996), アルファルファでは 6 mM-10 分間, リーキでは 4 から 7 mM-15 分間 (Ando et al., 1997), トマトでは 10 mM-15 分間 (Chen and Adachi, 1998) の結果が報告されている。本章で明らかにした条件は、これらの濃度と処理時間の中では比較的が高く、'改良伯州 5 号' で 10mM-15 分間, '早どり伯州' で 20mM-15 分間であった。しかし、ニンジンでは 15 mM と高濃度の報告例 (Imamura et al., 1988) もあることから、一般的には、IOA によるプロトプラストの不活性化濃度は、対象とする種に依存する (Iriawati et al., 1996) とともに、本章で明らかにしたように品種にも大きく依存する (Fig. 5-1.)。

プロトプラスト融合が検討された初期の段階では、ポリエチレングリコールや塩化カルシウムなどの化学試薬による融合が行われていたが、1980 年代になって電気融合法が開発された (野田と十川, 1989)。本実験においては、1 回の電気融合に要する時間はわずか数分と極めて短時間で完了し、毎回の実験で再現性のある結果が得られ、かつ、毒性がないことから簡便な操作で実施できることが実証された。その結果、本研究においては合計 417 個のコロニーを獲得することができた。引き続き植物体再生試験では、融合処理由来のカルスから約 10% の頻度で植物体が再生した (Table 5-2., Fig.5-3.)。しかしながら、約半数の再生植物は 1 ヶ年間の培養中に生育を停止するか、もしくは枯

死した。また、発根不良、生育の遅延、あるいは葉身のねじれなど、形態的に奇形と考えられる多くの個体も観察された。このような現象は対称あるいは非対称細胞融合でしばしば報告されている (Ando et al., 1997; Chen and Adachi, 1998)。本研究ではその詳細な評価分類について検討しなかったが、実用的な品種開発を目的とする観点からすると、今後の重要な課題として残された。

フローサイトメーターによる細胞遺伝学的調査を行った結果、分析した 15 個体の再分化植物中、4 個体 (27%) はネギの DNA 含量の 2 倍を有しており、4 倍性の植物と判断された (Table 5-3.)。さらに、KS-1 と HS-8 の 2 個体について染色体数を調査した結果、32 本の染色体を有していたことから (Fig. 5-7.)、これら 2 個体はネギとタマネギとの複 2 倍体 ($2n = 4x = 32$) と考えられた。また、再分化植物の 4 個体 (2C+4C と表記) は第 1 次および第 2 次のピークが同等であることから、2 倍性と 4 倍性の核ゲノムを合わせ持つキメラ個体と推定された。

近年の分子生物学の発展は目覚しく、その中でも DNA 解析技術は顕著である。本章においてもこれらの知見を基にして、プロトプラスト融合由来の再生植物を対象として核ゲノムおよび細胞質ゲノムの解析を行った。ネギの細胞質をタマネギのそれと置換することによって、CMS 系統を育成することが最終の目的の一つとして位置付けられることから、細胞質ゲノムの動態に注目し葉緑体およびミトコンドリアゲノムについて詳細に解析した。

核ゲノムに特異的な rRNA ITS 領域の解析では、再分化植物 16 個体の中で、2 個体 (KS-1 および HS-8) はネギとタマネギの両者の rRNA ITS 領域を保有していた。すなわち、これら 2 個体はネギとタマネギとの体細胞雑種と考えられた。前述の細胞遺伝学的解析結果から、本 2 個体は 4 倍性の個体であることが示唆されており、これらの結果を合わせ考えると、本 2 個体はネギとタマネギの複 2 倍体と考えられる。また、他の 14 個体の中にも、RAPD 分析により融合親に検出されない新規の DNA 断片が増幅されたことから (山下と下中, 未発表), 14 個

体の中にも体細胞雑種がある可能性も示唆される。

葉緑体に座する *rbcL*-ORF106 の分析結果から (Fig. 5-9.), 分析した 16 個体中の 4 個体 (KS-1, HS-1, HS-2 と HS-3) はタマネギタイプの葉緑体を有していることが明らかとなった。上記の核 DNA の解析結果は, これら 4 個体は融合親の両方あるいはネギタイプの核ゲノム構成を示唆することから, これらも細胞融合由来の植物と考えられる。興味深いことに, HS-1, HS-2 と HS-3 の 3 個体はネギタイプの核ゲノムを持ち, タマネギタイプの細胞質を有した個体といえる。すなわち, 細胞質置換されたネギが開発されたことが強く示唆される。

前述のように, KS-1 個体はネギとタマネギの複 2 倍体と考えられ, タマネギタイプの葉緑体を有することが示された興味深い個体であるので, ミトコンドリアゲノムの動態についてサザンブロット法により分析した (Fig. 5-10.)。その結果, 本個体はネギのミトコンドリア特異的なバンドが検出されるとともに, タマネギとほぼ同等の位置で *cox I* とハイブリダイズした。このことは, プロトプラスト融合によって新たなミトコンドリアゲノムが創出されたことを示している。

以上のように, 本章ではネギとタマネギとのプロトプラスト融合を行い, いくつかの体細胞雑種あるいは細胞質置換されたネギを開発することが可能となった。同時に, これらの事実は, ネギとタマネギとの体細胞雑種あるいは細胞質雑種を育成するためのプロトプラスト融合技術が体系化されたことを示している。

得られている系統はさび病抵抗性のネギ品種育成のための素材として, あるいは, ネギ CMS 系統の候補としての利用が期待される。そのためには, これらの農業上の形質を評価することとともに, 開花を待って花粉稔性および種子稔性の調査が必要である。これらは今後の課題として残されている。

第 4 節 摘 要

電気細胞融合により, ネギ (*Allium fistulosum* L., $2n = 2x = 16$)

とタマネギ (*A. cepa* L., $2n = 2x = 16$) との種間体細胞雑種を検討した。得られた結果は以下のとおりである。

(1) ネギのプロトプラストからのコロニー形成を阻害するためのヨードアセトアミド (IOA) 濃度は、‘改良伯州 5 号’ と ‘早どり伯州’ で異なり、それぞれ 10 および 20mM であった。

(2) IOA 処理を行ったネギプロトプラストと分裂能を持たないタマネギプロトプラストを混合し、ヘテロカリオンのみが選択的に発達するための細胞融合法を構築した。その結果、培養 45 日目には 417 個のコロニーが得られ、その内の約 80% がカルスへと発達した。

(3) 325 個中の 33 個 (10.1%) のカルスからシュートの発達が認められた。これらの個体の中には奇形を示すものもあったが、2 個体はガラス温室で生育した。

(4) 細胞遺伝学および DNA 解析を行った結果、ガラス温室内の個体はネギまたはタマネギの葉緑体を有する複二倍体 ($2n = 4x = 32$) の体細胞雑種であることが明らかとなった。さらに、他の 3 個体はネギの核ゲノムとタマネギ由来の葉緑体を有していた。

(5) 体細胞雑種の 1 個体のミトコンドリアゲノムを解析した結果、その両親のゲノム由来と考えられる新たなミトコンドリアゲノムが構築されたことが明らかとなった。

第V章 総 合 考 察

鳥取県西部地帯では古くからネギの栽培が盛んで、‘伯州ネギ’と称される柔らかくて美味しいネギが生産されてきている(中原・近藤, 1997)。しかし、さび病の蔓延や均一な生育をもたらす市販の F₁ 品種の流通によって、伝統のある良食味の‘伯州ネギ’の生産は衰退の傾向を示している。

そこで本研究は、鳥取県の在来の‘伯州ネギ’を対象として、さび病抵抗性の付与および細胞質雄性不稔系統を育成することを目指し、ネギとタマネギとの体細胞雑種の育成を検討した。ネギ体細胞雑種の育成の基礎となるネギ懸濁細胞培養、プロトプラストからの植物体再生系、効率的な電気融合法はこれまでに報告がなかった。従って、これらの生物工学に関する個々の技術の確立を図り、最終的に一連の技術を総合化し、最終的にネギとタマネギとの体細胞雑種の開発を行った。

ネギ属植物においても早くからプロトプラストの単離と培養に関する研究(Otsuki and Takebe, 1969; Bawa and Torrey, 1971; Schnabl, 1980; 田代ら, 1984; 大澤・高柳, 1984; Feller, 1993)が精力的に進められた。しかし、その再現性のあるプロトプラスト培養系に関する研究は1990年代に入ってからで、リーキ(Buiteveld and Creemers-Molenaar, 1994)、タマネギ(Hansen et al., 1995)、ニンニク(Ayabe et al., 1995)の培養系が相次いで報告された。その中にあって、ネギのプロトプラスト培養系に関する研究は立ち遅れており、現在に至るまでその研究は実施されていなかった。本研究ではネギの懸濁細胞培養を確立し(第II章)、その培養細胞を材料として、プロトプラストの単離と培養条件を検討した。その結果、再現性のあるプロトプラストからの植物体再生系を確立することができた(第III章)。本研究で確立した体系は、ネギに関する最初の成功例と考えられる。

これら一連の技術の体系化が可能となったのは、ネギの懸濁培養細胞からプロトプラストを単離した点と、プロトプラストに適した培地

を開発した点にある。Dunstan and Short (1977) はタマネギカルスの培養に適した BDS 培地を確立し、その後ネギ属植物の組織・細胞培養において広く利用されるに至った。本研究において、この知見を基礎としてネギプロトプラスト培養培地を検討し、13種の成分についてその最適化を図り、ネギのプロトプラスト培養に適した培地を確立することができた (Table 3-12.)。現在までのところ、本培地を用いることによって、‘改良伯州 5号’のみならず‘早どり伯州’、‘九条’、‘坊主しらず’などのネギプロトプラスト培養が可能であることが確認されている (未発表)。今後、新たなネギ品種はもとよりネギ属植物を対象としたプロトプラスト培養において、有用な知見を提供するものと考えられる。

さらに、プロトプラスト培養系を利用して、倍数性個体、薬剤耐性個体、ストレス耐性個体などの細胞選抜技術の適用が可能である。また、プロトプラスト培養それ自体、温和な変異を誘発することが知られている (廣近, 1999)。Shepard et al. (1980) は、ジャガイモの 1 品種の‘ラセット・バーバンク’でプロトプラストからの植物体再生系を確立し、1万個体以上の植物体を育成した。これらを圃場レベルでジャガイモ斑点病 (病原菌; *Phytophthora infestans*) の検定を行ったところ、20個体の抵抗性のクローンが得られた。本研究では未検討となったが、プロトプラストからの再生植物‘protoplast clone’ (Binding and Reinert, 1986) を利用し、種々の病害の耐病性検定を行い選抜することによって、耐病性品種を育成することは興味ある課題である。

ネギ属植物の体細胞雑種育成の成功事例は Buiteveld et al. (1998) によって報告されたリーキとタマネギとの種間雑種である。彼らはリーキにタマネギの病害抵抗性を導入することを目的として、両者の体細胞雑種 142 個体を得ている。本研究においては、ネギにタマネギのさび病抵抗性遺伝子を付与することと、ネギの細胞質をタマネギのそれと置換したネギ個体の開発を目的として、電気的なプロトプラスト融合によりネギとタマネギとの体細胞雑種が育成された (第IV章および第V章)。これらの一連の研究は、ネギ属植物において Buiteveld et al.

に次ぐ貴重な成果と考えられる。ネギの体細胞雑種の開発という観点では初めての成果と考えられる。

現在のところ属にわたる遠縁の体細胞雑種の育成は困難とされる(亀谷, 1998)。現象的には, 遠縁になるほど片親の染色体の脱落が起こり, 遺伝的不安定性の増大とともに, 形質異常や不稔になることが知られている(黒田, 1992; 亀谷, 1998)。そのために近年は対称プロトプラスト融合よりも非対称プロトプラスト融合が試みられており, 一方の核ゲノムを不活性化した手法が採られている(黒田, 1994)。今回の研究で, 興味深いことにネギの細胞質がタマネギのそれに置換された3個体(HS-1, HS-2, および HS-3)が得られているが, ネギの細胞質を他のネギ属植物のそれと置換するためには, 非対称プロトプラスト融合の検討が望まれる。すなわち, タマネギなどのプロトプラストに X 線 (Feher et al., 1992; Sakai and Imamura, 1993; Kisaka and Kameya, 1994), ガンマ線 (Kao et al., 1992; Schoenmaker et al., 1994), あるいは紫外線 (Hall et al., 1992a, 1992b) などの放射線を照射して核ゲノムの一部あるいは大部分を破壊した後, 細胞質を不活性化したネギプロトプラストと融合する手法である。Fig.6-1 に示したように, 対称融合技術にわずかな改変を加えることによって非対称プロトプラスト融合が可能となる。Yamashita et al.(1999) は, 戻し交雑によってネギの細胞質を *Allium galanthum* Kar. et Kir. のそれと置換することによって, 細胞質雄性不稔系統の育成に成功している。非対称プロトプラスト融合はより短期間での細胞質置換を可能にする手法である。また, 種々の細胞質で置換した系統は, 核と細胞質の親和性を解析するための興味ある知見を提供することになると期待される(亀谷, 1998)。

近年, 分子生物学的手法による解析技術の進展はめざましく, ネギ属植物においても RAPD (Havey et al., 1996; Al-Zahin et al., 1997), RFLP (Harvey et al., 1996; KiKetal., 1997; Sato, 1998; Yamashita et al., 1998; Harvey and Leite, 1999, Yamashita et al., 2000; Yamashita et al., 2001), サザンブロット法 (Havey, 1995; Buiteveld

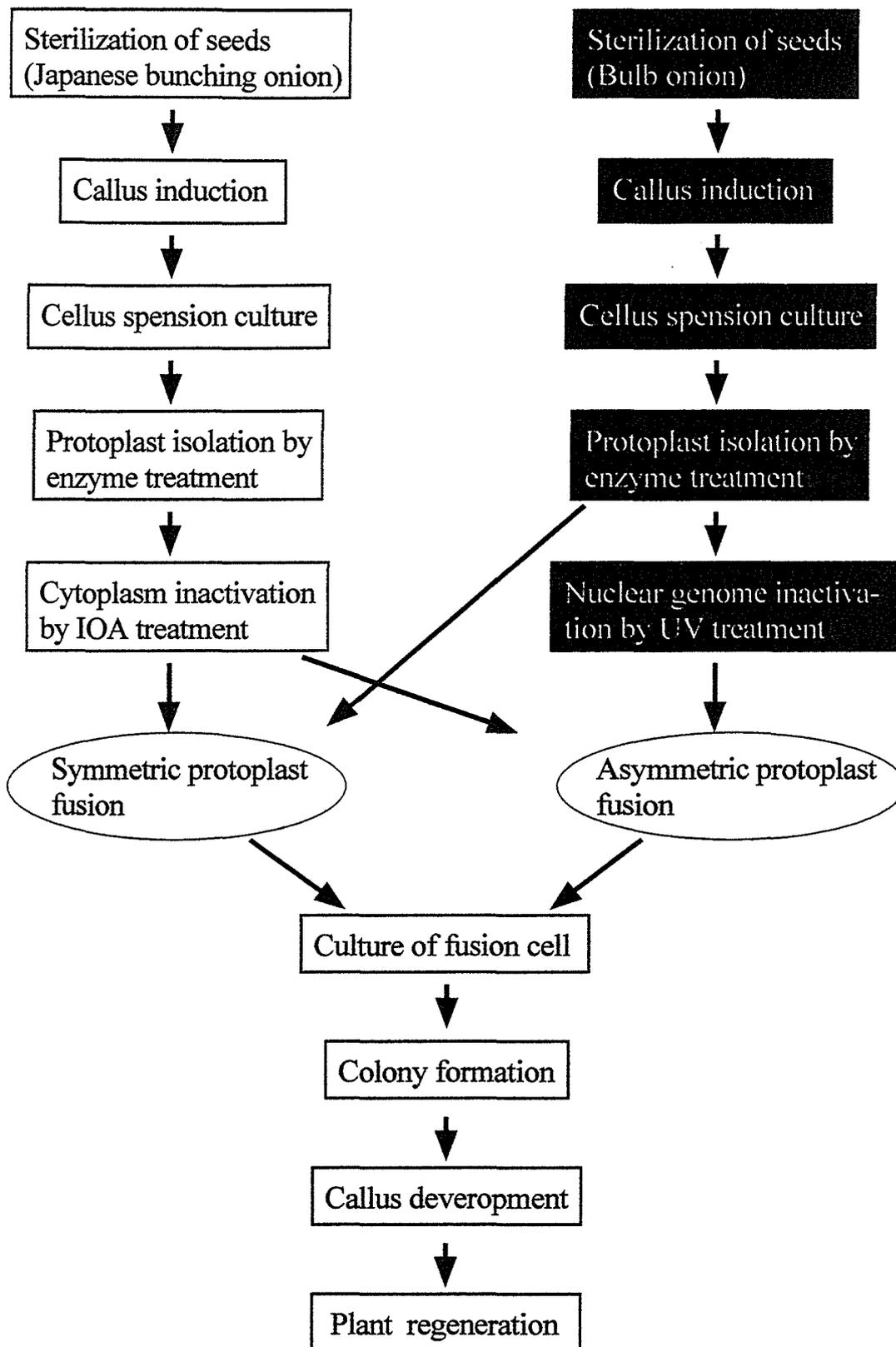


Fig. 6-1. A scheme for developing somatic hybrids or cybrids between Japanese bunching onion and bulb onion.

et al., 1998), GISH (Buiteveld et al., 1998) などの手法が開発されている。本研究においても、これらの知見を参考として PCR 法を取り入れ、雑种植物の解析を行った (第 V 章)。その中で、体細胞雑種のミトコンドリアゲノムを解析した結果、興味深いことにネギとタマネギのミトコンドリア遺伝子を合わせ持つ個体を得られた。このことは、葉緑体の置換とともにミトコンドリアの改変の可能性を示しており、‘細胞質育種’に貴重な示唆を与えるものである。従来の育種があまりに核ゲノムに偏重していたことから、核と細胞質ゲノムの相互作用を現実の作物育種に適用 (木下, 1994) するためには、今後さらに検討するに値する手法といえる。

本研究で得られた体細胞雑種の一部は、ガラス温室内において生育しており、今後植物の形態のみならず、さび病抵抗性、細胞質雄性不稔など農業上の重要な形質の発現を詳細に調査することが必要であるが、ネギの育種上極めて有用な素材を提供したものと考えられる。鳥取県で生産される伝統のある‘伯州ネギ’は衰退の傾向を示している。本研究は、耐病性や均一な生育が確保される新‘伯州ネギ’の育成に寄与するものと期待される。

和 文 摘 要

ネギ (*Allium fistulosum* L., $2n = 2x = 16$) の千住品種群に属する‘伯州ネギ’は鳥取県において集団選抜により育成された良食味の品種である。しかしながら、*Puccinia alli* に起因するさび病に対して罹病性であり、さらに、集団選抜によって育成された品種であることから生育の不均一性が問題として残されている。前者のさび病についてはさび病抵抗性遺伝子の導入が望まれるが、ネギ品種の中では現在のところ本遺伝子は見つかっていない。一方、タマネギ (*Allium cepa* L., $2n = 2x = 16$) は本病に対して比較的抵抗性であることが知られていることから (Jennings et al., 1990)、ネギとタマネギとの体細胞雑種を育成することによって本病に抵抗性の遺伝子の導入が可能と考えられる。後者の問題点については細胞質置換により育成される雄性不稔系統を利用した F₁ 品種の開発が有効である (Yamashita et al., 1999)。近縁種からの核あるいは細胞質遺伝子の導入は体細胞雑種の育成によって可能である (Karim and Adachi, 1996)。

これらの観点から本研究はネギとタマネギの体細胞雑種の育成を目的として行われ、その目的を達成するためにネギの懸濁細胞培養系、プロトプラスト培養および植物体再生系、プロトプラスト融合法などの一連の生物工学的手法を確立した。

1 ネギの懸濁細胞培養系および植物体再分化系の確立

ネギのカルス誘導は、BDS 培地 (Dunstan and Short, 1977) を基本培地として、これに 0.2 M ショ糖, 4.5 μ M 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 0.44 μ M 6-benzylaminopurine (BAP) および 1.0 g \cdot l⁻¹ のカザミノ酸をそれぞれ添加して行った。幼植物の茎盤部あるいは成植物の茎頂近傍組織を外植体としてカルス誘導が可能であった。ネギのカルス誘導は、種子を用いて得られる幼植物体茎盤部が年間を通じて利用できることから、実験を実施するに際しては茎盤部が有用と考えられた。

ネギの懸濁細胞培養を確立するためには1 mm 径のステンレス製メッシュ上で細胞塊を細粒化することが必須であった。懸濁細胞培養のための培地はBDS培地に $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ のカザミノ酸を添加した培地が適していた。また、0.2 M のショ糖を添加することによって細胞質に富み液胞化していない細胞の割合が多くなることが認められた。カルスからの植物体再生率は $0.5 \mu \text{M}$ α -naphthaleneacetic acid (NAA)と $1.0 \mu \text{M}$ BAP の添加した場合に最高値を示した。また、カザミノ酸の添加は植物体の再生に効果的であった。カルスからの植物体再生は、継代培養回数が7回では約70%であったが、14代の継代培養回数では植物体の再生は認められなかった。

2 ネギのプロトプラスト培養および植物体再生法の確立

プロトプラストの単離と培養のための諸条件を検討した。プロトプラストの単離は酵素液中のマニトール濃度を0.6 M にした場合に 9.6×10^6 個 $\cdot \text{1g FW}^{-1}$ と最高値を示し、フルオレセイン二酢酸染色による生存率(Larkin, 1976)は95%以上であった。プロトプラストの単離と精製に際しては $60 \times \text{g}$ の遠心分離条件が適当であった。

BDS 無機塩組成を基本にしてプロトプラスト培養に適した培地組成を検討した。その結果、硝酸カリウムは5 mM が適当であり、植物ホルモンは $2 \mu \text{M}$ 2,4-D と $1 \mu \text{M}$ BAP の組み合わせで細胞分裂率が最高値を示した。プロトプラスト培養のための浸透圧は $0.60 \text{ osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 前後が適当であり、0.2 M のショ糖、0.2 M のブドウ糖、および0.05 M の果糖の添加で細胞分裂が促進された。3種のビタミン組成を検討した結果、TM-2 (Shahin, 1985) が最適であった。さらに、イノシトール、アスコルビン酸およびシステインの適正濃度はそれぞれ、0.56 mM, 1 mM, および1 mM であることが示された。また、プロトプラスト培養に際しては照明は阻害的であることが明らかとなった。

プロトプラストは培地中の糖濃度を漸減することによってコロニーへと発達した。45日目の小カルスをカルス形成培地に移植してその発達

を促した。2 mm 大に発達したプロトプラスト由来カルスを供試し、改変 MS 培地を用いて植物体再生試験を行った。2 - 3 ヶ月後には置床した 75 個のカルスの中の 25 個 (32 %) からシュートの形成が認められた。これらのシュートは植物ホルモンを含まない培地に移植すると発根した。さらに、これらの幼植物はガラス温室内で順化した結果、正常に生育した。

3 ネギとタマネギとの電氣的細胞融合条件

プロトプラスト融合によりネギとタマネギとの体細胞雑種を開発するために効率的で再現性のある電氣的細胞融合条件を検索した。細胞融合液、電気融合のためのパラメーター、および細胞密度の諸条件を検索し、その適正な条件を明らかにした。ネギは懸濁培養細胞由来の白色プロトプラストを用い、一方、タマネギは幼植物由来の葉緑体を有する緑色プロトプラストを単離して、両者の細胞融合試験を行った。この方法によってヘテロカリオンを容易に識別することができた。電気細胞融合のための細胞懸濁液は 0.5 mM のカルシウム溶液が適していた。プロトプラスト融合のための電気パラメーターは、 $1.5 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ のパルス電界強度、40 秒の初期交流時間、50 μ 秒のパルス幅が最適と考えられた。 1.5×10^5 個 $\cdot \text{ml}^{-1}$ のプロトプラスト密度で融合を行うと最高のヘテロカリオン形成率が得られ、その値は 7 % 以上であった。

4 電気融合によるネギとタマネギとの体細胞雑種の開発

電気細胞融合によりネギ (*Allium fistulosum* L., $2n = 2x = 16$) とタマネギ (*A. cepa* L., $2n = 2x = 16$) との種間体細胞雑種を育成した。ネギのプロトプラストからのコロニー形成を阻害するためのヨードアセトアミド (IOA) 濃度を明らかにした。IOA 処理を行ったネギプロトプラストと分裂能を持たないタマネギプロトプラストを混合し、ヘテロカリオンのみが選択的に発達するための細胞融合法を構築した。その

結果，培養 45 日目には 417 個のコロニーが得られ，その内の約 80% がカルスへと発達した．325 個中の 33 個（10.1%）のカルスからシュートの発達が認められた．これらの個体の中には奇形を示すものもあったが，2 個体はガラス温室で生育した．細胞遺伝学および DNA 解析を行った結果，ガラス温室内の 2 個体はそれぞれネギとタマネギの葉緑体を有する複二倍体 ($2n = 4x = 32$) の体細胞雑種であることが明らかとなった．さらに，他の 3 個体はネギの核ゲノムとタマネギ由来の葉緑体を有していた．これらの個体のネギの育種上での利用について考察した．

Summary

A local variety of Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L., $2n = 2x = 16$), 'Hakushu-negi' belonging to the variety group 'Senju', has been selected for taste by mass selection and cultivated in Tottori Prefecture. There remain, however, problems of susceptibility to rust disease caused by *Puccinia allii* and a lack of uniformity in growth due to open pollination. To resolve the former problem, resistant genes for rust disease should be introgressed, though these genes do not exist in the varieties of Japanese bunching onion. On the other hand, bulb onion (*A. cepa* L., $2n = 2x = 16$) is comparatively resistant to this disease (Jennings et al., 1990) and these genes can be introgressed by somatic hybridization. To dissolve the latter problem, alloplasmic male sterile strains are useful to develop the F₁ hybrid in Japanese bunching onion (Yamashita et al., 1999). The introduction of nuclear and/or cytoplasmic genes from related species should be possible with the technology of somatic hybridization (Karim and Adachi, 1996).

In this respect, this study focused on the development of the somatic hybrid plants between Japanese bunching onion and bulb onion. To do this, the biotechnological methods, such as cell suspension culture, protoplast culture and subsequent plant regeneration, and electric protoplast fusion systems were established.

1. Establishment of cell suspension cultures and plant regeneration in Japanese bunching onion.

Callus induction for Japanese bunching onion was established on BDS medium (Dunstan and Short, 1977) supplemented with 0.2 M sucrose, 4.5 μ M 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 0.44 μ M 6-benzylaminopurine (BAP), and 1.0 g · l⁻¹ casamino acids. Stem disc of plantlet or apical meristem region of mature plant was available as an explant of callus

induction. In practical use, stem disc was useful because it could be utilized all the year round in seed-producing varieties of Japanese bunching onion. To establish cell suspension culture in Japanese bunching onion, filtration of cell clumps by use of stainless steel sieves with 1 mm pore size was essential. It resulted that BDS medium supplemented with $200 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ casamino acids was suitable for cell suspension culture. It also revealed that higher proliferation rate of the cytoplasm-rich and non-vacuolated cells was achieved in the medium supplemented with 0.2 M sucrose. The highest rate of plant regeneration from callus was obtained on the medium supplemented with $0.5 \mu \text{M}$ α -naphthaleneacetic acid (NAA) and $1.0 \mu \text{M}$ BAP. The addition of casamino acids was effective for plant regeneration. It revealed that plant regeneration was capable within the 7th subculture at the rate of around 70 %, however, at the 14th subculture plant regeneration was not observed.

2. Establishment of protoplast culture and plant regeneration in Japanese bunching onion.

Several conditions were examined for isolation and culture of protoplasts. For isolation of protoplasts, the optimal concentration of mannitol in the enzyme solution was 0.60 M. In this condition, 9.6×10^6 protoplasts $\cdot \text{lg FW}^{-1}$ was yielded and the viability of these protoplasts were above 95 % by the test of fluorescent diacetate (Larkin, 1976). For the isolation and purification of protoplasts by centrifuging, the force condition of $60 \times g$ was suitable.

Based on BDS inorganic salts, nutrient media suitable for protoplast culture were investigated. The optimum cell division was achieved with 5 mM potassium nitrate and a combination of $2 \mu \text{M}$ 2,4-D and 0.2 or $1 \mu \text{M}$ BAP. The suitable osmolality for protoplast culture was around $0.60 \text{ osmol} \cdot \text{kg}^{-1}$, whereas a combination of 0.2 M sucrose, 0.2 M glucose and 0.05

M fructose accelerated cell division. It resulted that TM-2 (Shahin, 1985) was most effective among the three vitamin-types tested. Furthermore, it also revealed that suitable concentrations of inositol, ascorbic acid and cysteine was 0.56 mM, 1 mM, and 1mM, respectively. In addition, illumination for protoplast culture was deleterious.

The protoplasts developed into colonies by gradual reduction of sugar concentration. After 45 days of culture, numerous micro-calli formed which were subsequently transferred to a callus formation medium. Plantlets were regenerated by transferring protoplast-derived calli of ca. 2 mm in diameter to a modified Murashige-Skoog medium. Of the 75 calli inoculated, 24 (32%) gave rise to green shoots on a regeneration medium 2 to 3 months after inoculation. These shoots rooted when cultured on a hormone-free medium. These plantlets were successfully acclimatized and grew normally in a greenhouse.

3. Conditions of electric protoplast fusion between Japanese bunching onion and bulb onion.

For the purpose of developing somatic hybrid plants between Japanese bunching onion and bulb onion, effective and reproducible conditions for electric protoplast fusion were examined. Comparative studies of various combinations on composition of fusion solution, electric parameters for fusion and protoplast density were carried out and suitable conditions could be clarified. White protoplasts of Japanese bunching onion were isolated from suspension cultured cells and green protoplasts of bulb onion were from young leaves with chloroplasts. These were fused each other and the heterokaryons were distinguished from others. The 0.5 mM calcium solution was most suitable for electrofusion. The optimum electric conditions for protoplast fusion were identified; $1.50 \text{ kV} \cdot \text{cm}^{-1}$ for pulse field strength, 40 seconds for AC time, and 50μ second for pulse width. The highest yield of

protoplasts \cdot ml⁻¹.

4. Production of somatic hybrid plants between Japanese bunching onion and bulb onion *via* electrofusion

Interspecific somatic hybrids between Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L., $2n = 2x = 16$) and bulb onion (*A. cepa* L., $2n = 2x = 16$) were produced by the electrofusion of protoplasts. A concentration of iodoacetamide (IOA) suitable for inhibiting the formation of colonies from protoplasts in Japanese bunching onion was used. IOA-treated protoplasts of Japanese bunching onion and untreated protoplasts of bulb onion were mixed together and fused, with the expectation that only heterokaryons would selectively develop into colonies. Four hundred and seventeen colonies had formed from fusion products after 45 days culture and approximately 80 % of them grew into calli. Plant regeneration was achieved for 33 out of 325 (10.1 %) calli. Some regenerants expressed abnormalities but two were successfully transplanted in a greenhouse. Cytogenetical and DNA analyses revealed these two regenerants to be amphidiploids ($2n = 4x = 32$). Furthermore, it was shown that another three regenerants possessed the nuclear genome of Japanese bunching onion while their chloroplasts were from bulb onion. The application of these hybrids to a breeding program for Japanese bunching onion was discussed.

謝 辞

本研究を完成するに当たっては、鳥取大学農学部教授安室喜正博士にはご指導と激励を戴いた。また、島根大学生物資源科学部教授細木高志博士には、論文執筆のご指導を戴いた。鳥取大学農学部助教授富田因則博士には、実験のご指導および文献の紹介を戴いた。ここに深甚の感謝の意を表す。これら諸先生のご指導がなかったならば本研究は成立し得なかった。

鳥取県園芸試験場前場長内田正人博士および現場長井上耕介氏には、研究を進める上でご高配を戴くとともにたえず激励して戴いた。また、同試験場生物工学研究室室長田平弘基氏、山下聡氏、森本隆義氏、米村善栄氏には、本研究を進めるに当たって有益な議論を戴くとともに、実験の一部を遂行して戴いた。ここに記して篤くお礼申上げる。

とっとり花回廊前園長岡森裕氏、現園長上場重俊氏、同顧問近藤司氏には激励を戴くとともに、研究遂行上の便宜を図って戴いた。また、同園芸部園芸展示課長木嶋哲人氏および同花壇管理課長福本明彦氏には、便宜を図っていただき大変ご迷惑をお掛けした。ここに記して深謝する。

引用文献

- Akagi, H., T. Taguchi and T. Fujimura. 1995. Stable inheritance and expression of the CMS traits introduced by asymmetric protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 91 : 563—567.
- Al-Zahim, M., H. J. Newbury and B. V. Ford-Lloyd. 1997. Classification of genetic variation in garlic (*Allium sativum* L.) revealed by RAPD. *HortSci.* 32: 1102—1104.
- Ando, S., C. Takahashi, K. Ikumi, S. Matuda and T. Shimizu. 1997. Asymmetric somatic hybridization between alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivar and CMS line. *Breeding Sci.* 47: 195—201.
- 青葉 高. 2000. 日本の野菜. p. 120—126. 八坂書房. 東京.
- Ayabe, M., K. Taniguchi and S. Sumi. 1995. Regeneration of whole plants from protoplasts isolated from tissue-cultured shoot primordia of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep.* 15: 17—21.
- Bala Bawa, S. and J. G. Torrey. 1971. "Budding" and nuclear division in cultured protoplasts of corn, *Convolvulus*, and onion. *Bot. Gaz.* 132: 240—245.
- Barandiaran, X., N. Martin, M.F. Rodriguez-Conde, A. Di Pietro and J. Martin. 1999. Genetic variability in callus formation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Rep.* 18 : 434—437.
- Bark, O. H., M. J. Havey and J. N. Corgen. 1994. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of progeny from an *Allium fistulosum* × *A. cepa* hybrid. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119(5) : 1046—1049.
- Belarmino, M. M., T. Abe and T. Sasahara. 1996. Asymmetric protoplast fusion between sweet potato and its relatives, and plant regeneration. *Plant Tiss. Org. Cult.* 46: 195—202.

- Binding, H. and J. Reinert. 1986. Glossary. p.146 – 147. In: J. Reinert and H. Binding (eds). Differentiation of protoplasts and of transformed plant cells. Springer-Verlag. Berlin.
- Bracha, M. and N. Sher. 1981. Fusion of enucleated protoplasts with nucleated miniprotoplasts in onion (*Allium cepa* L.). Plant Sci. Let.23: 95 – 101.
- Buiteveld, J., P. F. Fransz, J. Creemers-Molenaar. 1994. Induction and characterization of embryogenic callus types for the initiation of suspension cultures of leek (*Allium ampeloprasum* L.). Plant Sci. 100: 195 – 202.
- Buiteveld, J. and J. Creemers-Molenaar. 1994. Plant regeneration from protoplasts isolated from suspension cultures of leek (*Allium ampeloprasum* L.). Plant Sci. 100: 203 – 210.
- Buiteveld, J., W. Kassies, R. Geels, M. M. van Lookeren Campagne, E. Jacobsen, J. Creemers-Molenaar. 1998. Biased chloroplast and mitochondrial transmission in somatic hybrids of *Allium ampeloprasum* L. and *A. cepa*. Plant Sci. 131: 219 – 228.
- Buiteveld, J., Y. Suo, M.M. van Lookeren Campagne and J. Creemers-Molenaar. 1998. Production and characterization of somatic hybrid plants between leek (*Allium ampeloprasum* L.) and onion (*A. cepa* L.). Theor. Appl. Genet. 96: 765 – 775.
- Cocking, E. C. 1960. A method for isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature. 187: 927 – 929.
- Chen, L. Z. and T. Adachi. 1998. Protoplast fusion between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*-complex: somatic embryogenesis, plant regeneration and morphology. Plant Cell Rep. 17: 508 – 514.
- Dolezel, J. and F. Novak. 1985. Karyological and cytological study of callus induction in *Allium sativum* L. J. Plant Physiol. 118: 421 – 429.

- Dunstan, D. I. and K. C. Short. 1977. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. *Physiol. Plant.* 41: 70–72.
- Fellner, M. 1993. Problems of garlic protoplast cultures—literature review, speculation and hypotheses. *Newsletter.* 71: 4–9.
- Frearson, E. M., J. B. Power and E. C. Cocking. 1973. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev. Biol.* 33: 130–137.
- Fridborg, G. 1971. Growth and organogenesis in tissue culture of *Allium cepa* var. *proliferum*. *Physiol. Plant.* 25: 436–440.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151–158.
- Hall, R. D., G. J. Rouwendal and F. A. Krens. 1992. Asymmetric somatic cell hybridization in plants. I. The early effects of (sub)lethal doses of UV and gamma radiation on the cell physiology and DNA integrity of cultured sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 234: 306–314.
- Hall, R. D., G. J. Rouwendal and F. A. Krens. 1992. Asymmetric somatic cell hybridization in plants. II. Electrophoretic analysis of radiation-induced DNA damage and repair following the exposure of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) protoplasts to UV and gamma rays. *Mol. Gen. Genet.* 234: 315–324.
- Hansen, E. E., J. F. Hubstenberger and G. C. Phillips. 1995. Regeneration of shoots from cell suspension-derived protoplasts of *Allium cepa*. *Plant Cell Rep.* 15: 8–11.
- Havel, L. and F. J. Novak. 1988. Regulation of somatic embryogenesis and Organogenesis in *Allium carinatum* L. *J. Plant Physiol.* 132 : 373–377.
- Havey, M.J. 1995. Identification of cytoplasm using the polymerase chain reaction to aid in the extraction of maintainer lines from

- open-pollinated populations of onion. *Theor. Appl. Genet.* 90: 263–268.
- Havey, M.J., J. J. King, J.M. Bradeen and O. Bark. 1996. Molecular markers and mapping in bulb onion, A forgotten monocot. *HortSci.* 31: 1116–1118.
- Havranek, P., and F. J. Novak. 1972. The bud formation in the callus cultures of *Allium sativum* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 68: 308–318.
- 廣近洋彦. 1999. 培養変異の一因としてのレトロトランスポゾンの活性化. *育種学の最近の進歩* 41: 37–40.
- 今村順・市川浩章・丹野礼子. 1988. ニンジンの細胞質雑種の作出. *Mitubishi Chemical R & D Review* 2: 70–76.
- Iriawati, H. Miyake, T. Taniguchi and Y. Takeoka. 1996. Effects of iodoacetamide on the fine structure of Azuki bean protoplast and its fusion product. *Jpn. J. Crop Sci.* 65: 532-539.
- Jennings, D. M., B. V. Ford-Lloyd, and G. M. Butler. 1990. Rust infections of some *Allium* species: An assessment of germplasm for utilizable rust resistance. *Euphytica* 49: 99 – 109.
- 亀谷寿昭. 1998. 遠縁植物間における体細胞雑種の新しい展開—細胞融合による核, 細胞質ゲノムの改変の可能性—. *育種学の最近の進歩* 40: 51–54.
- Kameya, T.. 1975. Induction of hybrids through somatic cell fusion with dextran sulfate and gelatin. *Japan. J. Genet.* 50: 235–246.
- Kao, K. N. and M. R. Michayluk. 1974. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. *Planta* 115: 355–367.
- Kao, K. N. and M. R. Michayluk. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta.* 126: 105–110.
- Karim, M. A. and T. Adachi. 1996. Phytohormonal responses for

- plant regeneration in bulbing (*Allium cepa* L.) and nonbulbing onions (*A. fistulosum* L.). SABRAO Journal. 28: 49–55.
- Karim, M. A. and T. Adachi. 1997. Cell suspension, isolation and culture of protoplasts of *Allium cepa*. Plant Cell, Tis. Org. Cul. 51: 43–47.
- 加藤忠司・山県真人・塚原貞雄. 1983. タマネギの窒素栄養診断のためのグルタミンについて. 土肥誌. 54: 319–324.
- Kik C., A. M. Samoylov, W. H. J. Verbeek and L.W.D. van Raamsdonk. 1997. Mitochondrial DNA variation and crossability of leek (*Allium porrum*) and its wild relatives from the *Allium ampeloursu*m complex. Theor. Appl. Genet. 94: 465–471.
- Kim. J.W. and W.Y. Soh.1996. Plant regeneration through somatic embryogenesis from suspension cultures of *Allium fistulosum* L. PlantSci. 114 : 215–220.
- Kisaka, H., H. Lee, M. Kisaka, A. Kanno, K. Kang and T. Kameya. 1994. Production and analysis of asymmetric hybrid plants between monocotyledon (*Oriza sativa* L.) and dicotyledon (*Daucus carota* L.). Theor. Appl. Genet. 84: 365–371.
- 木下俊郎. 1994. 高等植物における細胞質と核の相互作用の解析および作物育種への応用. 学術月報 47(6):12–22.
- Kojima, A. and Y. Nagato. 1992. Pseudogamous embryogenesis and the degree of parthenogenesis in *Allium tuberosum*. Sexual Plant Rep. 5: 79–85.
- 近藤司・中原守. 1997. 品種改良とその背景. p.76–80. 鳥取県白ねぎ沿革史. 鳥取県白ねぎ改良協会. 鳥取県.
- 小関良弘・小沢憲二郎. 1998. 良い細胞系と悪い細胞系の見分け方. p.58–61. 駒嶺穆・野村港二編著. 植物細胞工学入門.学会出版センター. 東京.
- 黒田秧. 1992. 細胞融合技術の現状と問題点. 農業技術 47 : 17–22.

- 黒田 秧. 1994. 非対称細胞融合技術開発の現状と展望. p.1-9. 農林水産技術情報協会編. 植物機能の強化・向上への挑戦—細胞内小器官等の導入による植物細胞の形質転換技術—. 東京.
- 桑田主税・成川 昇. 2001. 坊主不知ネギの交雑育種のための抽台促進法. 千葉農試報 42 : 23-30.
- Lancaster, J. E., E. M. Dommissie and M. L. Shaw. 1988. Production of flavour precursors [S-alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides] in photomixotrophic callus of garlic. *Phytochem.* 27: 2123-2124.
- Larkin, P. J..1976. Purification and viability determinations of plant protoplasts. *Planta.* 128: 213-216.
- Liu, J. H., M. Landgren and K. Glimelius. 1996. Transfer of the *Brassica tournefortii* cytoplasm to *B. napus* for the production of cytoplasmic male sterile *B. napus*. *Physiol. Plant.* 96: 123-129.
- Matsuda, Y. and T. Adachi. 1996. Plant regeneration via embryogenesis in commercial cultivars of Chinese chive (*Allium tuberosum* Rottl.). *Plant Sci.* 119: 149-156.
- 宮浦邦晃・品田裕二・中野雅章・山木貞一・越智. 1985. タマネギ新品種「せきほく」の育成について. 北海道立農試集報 53: 115-125.
- 水野 卓・金兵忠雄. 1955. ねぎ類の炭水化物に関する研究 (第1報). ネギの炭水. 日農化誌. 29: 665-671.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nea, L. J., G. W. Bates and P. J. Gilmer. 1987. Facilitation of electrofusion of plant protoplasts by membrane-active agents. *Boich. Biophy.* 897: 293-301.
- 長田敏行. 1979. プロトプラスト. p.161-216. 原田宏・駒嶺穆編. 理工学社. 東京.
- Nagata, T. and I. Takebe. 1970. Cell wall regeneration and cell

- division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta*. 92: 301 - 308.
- 中島寿亀. 1989. タマネギの胚様体利用による大量増殖. 農業技術 44:117-121.
- 中崎鉄也. 1995. 染色体の観察. p. 61-65. 谷坂隆俊編. 植物遺伝育種学実験法. 朝倉書店. 東京.
- Nehls, R.. 1978. The use of metabolic inhibitors for the selection of fusion products of higher plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 166: 117-118.
- Nikova, V., R. Vladova, R. Pundeva and D. Shabanov. 1997. Cytoplasmic male sterility in *Nicotiana tabacum* L. obtained through interspecific hybridization. *Euphytica* 94: 375-378.
- 野田幸太郎・十川好志. 1989. 電気パルスによる細胞融合・遺伝子導入法とその現状. 島津評論 46(4): 167-178.
- Novak, F.J. 1980. Phenotype and cytological status of plants regenerated from callus cultures of *Allium sativum* L. *Z. Pflanzenzuchtg.* 84: 250-260.
- Novak, F.J.. 1981. Chromosomal characteristic of long-term callus cultures of *Allium sativum* L. *Cytologia* 46: 371-379.
- Novak, F. J., L. Havel and Dolezel. 1986. *Allium*. p.419-456. D.A. Evans, W. R. Sharp and P. V. Ammirato (eds). *Handbook of plant cell culture 4. Techniques and applications.* Macmillan. New York.
- 大澤勝次・栗山尚志・菅原祐幸. 1981. 組織培養による栄養繁殖性野菜の大量増殖と利用に関する研究. I 植物体の大量誘導に及ぼす培養部位及び培地組成の影響. 野菜試験場報告 A. 9: 1-46.
- 大澤勝次・高柳謙治. 1984. プロトプラストを利用した野菜の育種方法の開発. 野菜試験場報告 A. 12: 9-28.
- Otsuki, Y. and I. Takebe. 1969. Isolation of intact mesophyll cells and their protoplasts from higher plants. *Plant and Cell*

- Physiol. 10: 917–921.
- Rambaud, C., A. Bellamy, A. Dubreucq, J-C. Bourquin and J. Vasseur. 1997. Molecular analysis of the fourth progeny of plants derived from a cytoplasmic male sterile chicory cybrid. *Plant Breeding*. 116:481–486.
- Sakai, T., H. J. Liu, M. Iwabuchi, J. Kohno-Murase and J. Imamura. 1996. Introduction of a gene from fertility restored radish (*Raphanus sativus*) into *Brassica napus* by fusion of X-irradiated protoplasts from a radish restore line and iodoacetamide-treated protoplasts from a cytoplasmic male sterile cybrid of *B. napus*. *Theor. Appl. Genet.* 93: 373–379.
- 作田正明. 1998. カルスからの懸濁培養細胞の誘導. p.51–52. 駒嶺 穆・野村港二編著.植物細胞工学入門. 学会出版センター. 東京.
- Schoenmakers, H.C.H., A-M. A. Wolters, A. de Hann, A. K. Saiedi and M. Koornneef. Asymmetric somatic hybridization between tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) and gamma-irradiated potato (*Solanum tuberosum* L.): a quantitative analysis. *Theor. Appl. Genet.* 87:713–720.
- Schnabl, H.. 1980. CO₂ and malate metabolism in starch-containing and starch-lacking guard-cell protoplasts. *Planta* 149: 52–58.
- Senda, M., J. Takeda, S. Abe, and T. Nakamura. 1979. Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation. *Plant Cell Physiol.*, 20(7): 1441–1443.
- Shahin, E. A.. 1985. Totipotency of tomato protoplasts. *Theor. Appl. Genet.* 69: 235–240.
- Shahin E.A. and K. Kaneko. 1986. Somatic Embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of Nonbulbing onions. *HortSci.* 21: 249–295.
- Sharma, D and D. R. Knott. 1966. The transfer of leaf-rust resistance from *Agropyron* to *Triticum* by irradiation. *Can. J.*

Genet. Cytol. 8: 137-143

Shepard, J. F., D. Bidney and E. Shahin. 1980. Potato protoplasts in crop improvement. Science. 208: 17-24.

Shigyo, M..1997. VIII. Chromosomal locations of RAPD markers in *A. cepa* Aggregatum group. p.36-39. Gene analysis of shallot (*Allium cepa* L. Aggreratum group) using a series of alien monosomic addition lines of Japanese bunching onion (*A. fistulosum* L.) with extra chromosomes from shallot. Ph. D. Thesis. Kagoshima Univ., Kagoshima, Japan.

下中雅仁・鷹見敏彦. 1991. ネギ「坊主不知」の茎頂培養に対するアミノ酸の効果. 鳥取県園試報 1: 27-35.

Smith, M. A. L., J. P. Palta and B. H. McCown. 1984. The measurement of isotonicity and maintenance of osmotic balance in plant protoplast manipulation. Plant Sci. Lett. 33: 249-258.

Song, P. and E. B. Peffley. 1994. Plant regeneration from suspension cultures of *Allium fistulosum* and an *A. fisulosum* × *A. cepa* interspecific hybrid. Plant Sci. 98: 63-68.

高儀雅俊・豊井一徳・一井眞比古. 1996. タマネギにおける根端組織由来カルスからの植物体再分化. 植物組織培養 13: 181-183.

高儀雅俊・竹村真理・一井眞比古. 1992. タマネギ組織培養における脱分化及び再分化に及ぼす植物ホルモンの影響. 香川大学農学部学術報告 44: 11-17.

Takebe, I., Y. Otsuki and S. Aoki. 1968. Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. Plant and Cell Physiol., 9: 115-124.

田村太郎. 1983. グルコース. p.297-298. 作物分析法委員会編. 栽培植物分析測定法. 養賢堂. 東京.

Tanikawa, T., M. Takagi and M. Ichii. 1996. Plant regeneration from suspension cultures of onion (*Allium cepa* L.). Plant Tiss.

- Cult. Let. 13: 259–264.
- Tanno-Suenaga, L., H. Ichikawa and J. Imamura. 1988. Transfer of the CMS trait in *Daucus carota* L. by donor-recipient protoplast fusion. Theor. Appl. Genet. 76: 855–860.
- 田代丞洋・宮崎貞巳. 1985. クローン増殖技術の変異の発生. p.66–76. 田中隆荘編著. クローン植物大量生産の実際技術. シーエムシー. 東京.
- 田代洋丞・橋本英昭・宮崎貞巳・金沢幸三. 1984. ネギ属植物の種々の器官・組織から単離されたプロトプラスト. 佐賀大農彙. 57: 115–119.
- 十川好志. 1989. 電気細胞融合. 植物細胞工学 1(1): 63–74.
- Valk, P., O.E. Scholten, F. Verstappen, R. C. Jansen and J.J.M. Dons. 1992. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived callus cultures of three *Allium* species. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 30: 181–191.
- Vasil, I. K. and V. Vasil. 1992. Advances in cereal protoplast culture. Physiol. Plant. 85: 279–283.
- Wang, G., Z. Xia and L. Wang. 1986. Regenerated plantlets from cultured mesophyll protoplasts of onion (*Allium cepa* L.). Acta Biologica Experimentalis Sinica. 19: 409–413.
- Wang, R. R. and X. Y. Zhang. 1996. Characterization of the translocated chromosome using fluorescence in situ hybridization and random amplified polymorphic DNA on two *Triticum aestivum* – *Thinopyrum intermedium* translocation lines resistant to wheat streak mosaic or barley yellow dwarf virus. Chromosome Res. 4: 583–587.
- 薛惠民・荒木肇・石嶺・八鍬利郎. 1991. ニンニクの底盤と花床部由来カルスにおける不定胚の形成と植物体再生. 園学雑. 60: 627–634.
- 八鍬利郎. 1978. ネギ植物としての特性. p.27–39. 新野菜全書 ネ

ギ類・タマネギ. 農文協. 東京.

- Yamashita, K. and Y. Tashiro. 2001. RFLP analysis of mitochondrial DNA in Wakegi onion. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 70 : 232–234.
- Yamashita, K., H. Arita and Y. Tashiro. 1999. Cytoplasm of a wild species, *Allium galanthum* Kar. et Kir., is useful for developing the male sterile lines of *A. fistulosum* L. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 68: 788–797.
- Yamashita, K., R. Noda, Y. Tashiro. 2000. Use of mitochondrial DNA polymorphisms to distinguish cytoplasms of cultivated and wild species *Cepa* of *Allium*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 69 : 396–402.
- Yamashita, K., T. Oyama, R. Noda, T. Miyazaki and Y. Tashiro. 1998. Comparative study on methods for identification of chloroplast DNA of cultivated and wild species in section *Cepa* of *Allium*. *Bull. Fac. Agr., Saga Univ.* 83: 111–120.
- Yamashita, K., T. Oyama, R. Noda, T. Miyazaki, S. Isshiki and Y. Tashiro. 2001. Phylogenetic relationships among cultivated and wild species in section *Cepa* of *Allium* based on RFLPs of mitochondrial and chloroplast DNAs. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 70 : 195–201.
- Zimmermann, U. and P. Scheurich. 1981. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta.* 151: 26–32.

公表論文リスト

第Ⅲ章

- 題 目 Establishment of Culture Medium for Protoplasts and Plant Regeneration in Japanese Bunching Onion (*Allium fistulosum* L.) .
- 著 者 名 Masahito Shimonaka, Takashi Hosoki, Motonori Tomita and Yoshimasa Yasumuro.
- 学術雑誌名 J. Japan. Soc. Hort. Sci. 70 (4): 431- 437. に
発表
- 発行年月日 2001 年 7 月 15 日

第Ⅳ章

- 題 目 ネギ(*Allium fistulosum* L.) とタマネギ(*A. cepa* L.)との電氣的細胞融合条件
- 著 者 名 下 中 雅 仁
- 学術雑誌名 鳥取県園芸試験場報告 第6号に発表予定
- 発行年月日 2002 年 7 月 (予定)

第Ⅴ章

- 題 目 Production of Somatic Hybrid Plants between Japanese Bunching Onion (*Allium fistulosum* L.) and Bulb Onion (*A. cepa* L.) via Electroporation
- 著 者 名 Masahito Shimonaka, Takashi Hosoki, Motonori Tomita and Yoshimasa Yasumuro.
- 学術雑誌名 J. Japan. Soc. Hort. Sci. 71 (5) に発表予定
- 発行年月日 2002 年 9 月 15 日 (予定)

そ の 他

第Ⅱ章

題 目 ネギの懸濁細胞培養と植物体の再生
著 者 名 下中雅仁・田平弘基・大村修司
学術雑誌名 育種学会雑誌 42 (別 1) : 37-39.
発行年 1992 年

第Ⅲ章

題 目 ネギプロトプラストの単離と培養
著 者 名 下中雅仁・前田英博・田平弘基・山下聡・大村修司
学術雑誌名 植物組織培養学会 13. 講演要旨. 51.
発行年 1993 年

題 目 ネギプロトプラストからの植物体再生
著 者 名 下中雅仁
学術雑誌名 育種学会雑誌 46 (別 2) : 160.
発行年 1996 年

第Ⅳ章

題 目 ネギとタマネギの体細胞雑種の作出
著 者 名 下中雅仁・森本隆義・川上和博・山下聡・田平弘基
学術雑誌名 育種学会雑誌 47 (別 2) : 318.
発行年 1996 年

題 目 ネギとタマネギとの電氣的細胞融合条件
著 者 名 下 中 雅 仁
学術雑誌名 園芸学会中四国支部要旨 37:37.
発行年 1998 年

END